

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST  
ZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

**Number 116-117**  
**Special Issue**  
Numer 116-117  
Numer specjalny

**Volume XV**  
Rok XV

**DECEMBER 2012**  
GRUDZIEŃ 2012

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**  
WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Krakow**  
Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

**EDITORIAL  
COMMITTEE:**  
KOMITET  
REDAKCYJNY:

**Editor-in-Chief**  
Redaktor naczelny  
**Jan Chłopek**

**Editor**  
Redaktor  
**Elżbieta Pamuła**

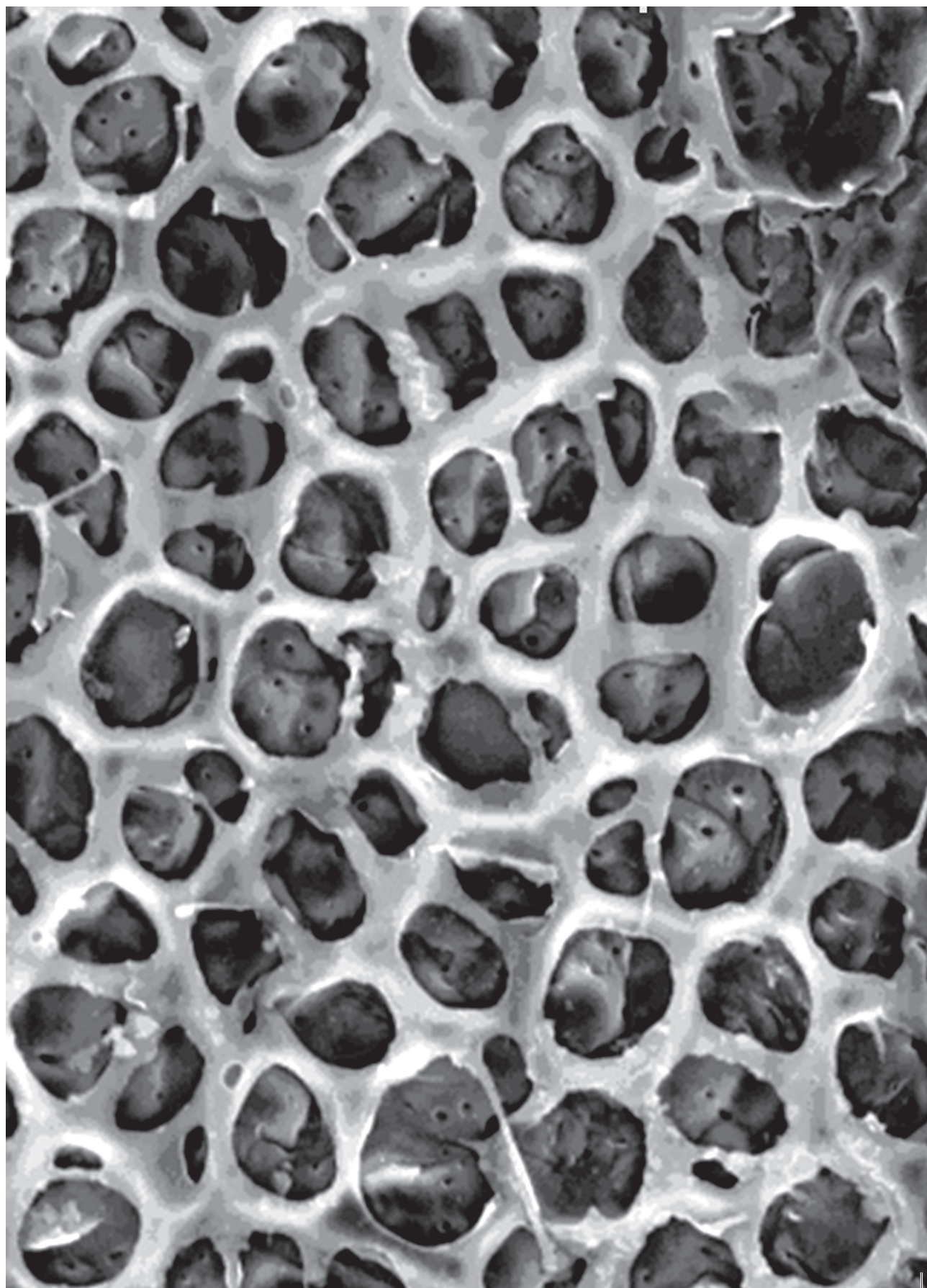
**Secretary of editorial**  
Sekretarz redakcji  
**Design**  
Projekt  
**Katarzyna Trala**  
**Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF  
EDITORIAL OFFICE:**  
ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST**  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland  
Akademia  
Górnictwo-Hutnicza  
al. Mickiewicza 30/A-3  
30-059 Kraków

**Issue: 200 copies**  
Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing  
House AKAPIT**  
Wydawnictwo Naukowe  
AKAPIT  
e-mail: wn@akapit.krakow.pl



# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

## INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

**Iulian Antoniac**

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

**Lucie Bacakova**

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

**Romuald Będziński**

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Marta Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Stanisław Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Maria Borczuch-Łączka**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Wojciech Chrzanowski**

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

**Tadeusz Cieślik**

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

**Jan Ryszard Dąbrowski**

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

**Matthias Eppe**

UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

**Andrzej Górecki**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Robert Hurt**

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

**James Kirkpatrick**

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

**Wojciech Maria Kuś**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Małgorzata Lewandowska-Szumieł**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Jan Marciniak**

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Sergey Mikhalovsky**

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

**Stanisław Mitura**

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

**Roman Pampuch**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Stanisław Pielka**

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

**Vehid Salih**

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

**Jacek Składzień**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW

**Andrei V. Stanishevsky**

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

**Anna Ślósarczyk**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Tadeusz Trzaska**

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

**Dimitris Tsipas**

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE



## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzyczność obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
  - TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 25 61  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma:  
**www.biomat.krakow.pl**

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41  
Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN  
Konto:  
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów  
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3  
ING Bank Śląski S.A. O/Kraków  
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
  - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:

Journal  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
AGH University of Science and Technology  
Faculty of Materials Science and Ceramics  
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 25 61  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website:  
**www.biomat.krakow.pl**

## Subscription terms

Subscription rates:  
Cost of one number: 20 PLN  
Payment should be made to:  
Polish Society for Biomaterials  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland  
ING Bank Śląski S.A.  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

# *XXIII Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE*

*10-13 October 2013  
Hotel "Perła Południa"  
Rytro, Poland*

**[www.biomat.agh.edu.pl](http://www.biomat.agh.edu.pl)**



**PAN**  
∞





## SPIS TREŚCI

<b>CERAMIC FOR RESTORATION DENTISTRY</b> L.I. PODZOROVA, A.A. IL'ICHEVA, N.A. MIKHAILINA, O.I. PEN'KOVA, L.I. SHVORNEVA, V.A. VOLCHENKOVA, S.V. KUTHEV	<b>1</b>
<b>COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE PREPARATIONS "BIOSITAL" AND "KAFAM" INFLUENCE COMBINED WITH ELECTROACUPUNCTURE ON THE HEALING OF ALVEOLAR PROCESSES OF THE MAXILLA BONES IN EXPERIMENT</b> I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, O.P. CHUDAKOV, A. PETCHURSKY	<b>2</b>
<b>COMPARATIVE CHARACTERISTICS FOR POST-OPERATIVE BONE WOUNDS HEALING AFTER «DENTAL ADGESIVE PASTE SULKOSERYL» AND COLLAGENOUS SPONGE «GELOPACK» APPLICATION IN TRETMENT</b> E.A. AVDEEVA, E.V. SAVITZKAYA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA	<b>4</b>
<b>A DEVICE FOR TESTING OF THE TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF INTERVEREBRAL DISC ENDOPROSTHESIS – SBT-03.1 SIMULATOR</b> A. MRÓZ, T. WIŚNIEWSKI, M. GIERZYŃSKA-DOLNA, J. MAGDA	<b>5</b>
<b>CYTOTOXICITY OF HYDROXYAPATITE COATINGS MODIFIED WITH SILVER NANOPARTICLES</b> J. SULEJ-CHOJNACKA, M. IGNATIEV	<b>6</b>
<b>INVESTIGATION OF INFLUENCE OF INTERNAL ARCHITECTURE ON MECHANICAL PROPERTIES OF 3D PRINTED SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING</b> B. OSTROWSKA, W. ŚWIEŻKOWSKI, K.J. KURZYDŁOWSKI	<b>8</b>
<b>ZASTOSOWANIE SKANINGOWEJ MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ DO OBRAZOWANIA ORAZ CHARAKTERYSTYKI NANOWŁÓKIEN POLIMEROWYCH STOSOWANYCH W INŻYNIERII TKANKOWEJ</b> J. KARBOWNICZEK, M. BUZGO, A. CZYRSKA-FILEMONOWICZ	<b>10</b>
<b>KOMPOZYTOWA POWŁOKA PEEK /BIOSZKŁO® NA STOPIE TYTANU Ti-6Al-7Nb DO ZASTOSOWAŃ W MEDYCYNIE</b> T. MOSKALEWICZ, S. SEUSS, A.R. BOCCACCINI, M. KOT, A. CZYRSKA-FILEMONOWICZ	<b>13</b>
<b>POWŁOKA HYDROKSYAPATY-TOWA NA NANO-RURKOWEJ WARSTWIE TLENKOWEJ NA STOPIE TYTANU</b> S. SOBIESZCZYK	<b>16</b>
<b>GENEROWANIE NANOPORÓW W POLIMEROWEJ WARSTWIE ZABEZPIECZAJĄCEJ POWIERZCHNIĘ IMPLANTÓW METALOWYCH W KIERUNKU KONTROLOWANEGO UWALNIANIA LEKÓW</b> M. GOŁDA, A. KOTARBA	<b>19</b>

## CONTENTS

<b>CERAMIC FOR RESTORATION DENTISTRY</b> L.I. PODZOROVA, A.A. IL'ICHEVA, N.A. MIKHAILINA, O.I. PEN'KOVA, L.I. SHVORNEVA, V.A. VOLCHENKOVA, S.V. KUTHEV	<b>1</b>
<b>COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE PREPARATIONS "BIOSITAL" AND "KAFAM" INFLUENCE COMBINED WITH ELECTROACUPUNCTURE ON THE HEALING OF ALVEOLAR PROCESSES OF THE MAXILLA BONES IN EXPERIMENT</b> I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, O.P. CHUDAKOV, A. PETCHURSKY	<b>2</b>
<b>COMPARATIVE CHARACTERISTICS FOR POST-OPERATIVE BONE WOUNDS HEALING AFTER «DENTAL ADGESIVE PASTE SULKOSERYL» AND COLLAGENOUS SPONGE «GELOPACK» APPLICATION IN TRETMENT</b> E.A. AVDEEVA E.V. SAVITZKAYA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA	<b>4</b>
<b>A DEVICE FOR TESTING OF THE TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF INTERVEREBRAL DISC ENDOPROSTHESIS – SBT-03.1 SIMULATOR</b> A. MRÓZ, T. WIŚNIEWSKI, M. GIERZYŃSKA-DOLNA, J. MAGDA	<b>5</b>
<b>CYTOTOXICITY OF HYDROXYAPATITE COATINGS MODIFIED WITH SILVER NANOPARTICLES</b> J. SULEJ-CHOJNACKA, M. IGNATIEV	<b>6</b>
<b>INVESTIGATION OF INFLUENCE OF INTERNAL ARCHITECTURE ON MECHANICAL PROPERTIES OF 3D PRINTED SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING</b> B. OSTROWSKA, W. ŚWIEŻKOWSKI, K.J. KURZYDŁOWSKI	<b>8</b>
<b>SCANNING ELECTRON MICROSCOPY APPLIED FOR VISUALIZATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMER NANOFIBERS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS</b> J. KARBOWNICZEK, M. BUZGO, A. CZYRSKA-FILEMONOWICZ	<b>10</b>
<b>COMPOSITE POLYETHERETHERKETONE / BIOGLASS® COATING ON Ti-6Al-7Nb ALLOY FOR MEDICAL APPLICATION</b> T. MOSKALEWICZ, S. SEUSS, A.R. BOCCACCINI, M. KOT, A. CZYRSKA-FILEMONOWICZ	<b>13</b>
<b>HYDROXYAPATITE COATING ON NANOTUBULAR OXIDE LAYER ON TITANIUM ALLOY</b> S.SOBIESZCZYK	<b>16</b>
<b>GENERATION OF NANOPORES IN PROTECTIVE POLYMER LAYER ON METAL IMPLANTS SURFACE FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY</b> M. GOŁDA, A. KOTARBA	<b>19</b>



<b>BADANIA WARSTWY WODNEJ ORAZ GRUP HYDROKSYLOWYCH W NANOKRYSTALICZNYCH HYDROKSYAPATYTACH METODAMI SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI ORAZ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO</b>	<b>22</b>
L. PAJCHEL, K. MARKOWSKA, W. KOŁODZIEJSKI	

<b>WSPOMAGANA PLAZMOWO METODA WYTWARZANIA POWŁOK CERAMICZNYCH Z AEROSZOLU</b>	<b>24</b>
B. PIETRZYK, S. MISZCZAK, H. SZYMANOWSKI, Z. GAWRONSKI	

<b>OCENA BIOKOMPATYBILNOŚCI KOMPOZYTÓW NA BAZIE CHITOSANU DO STOSOWANIA W INŻYNIERII TKANKOWEJ KOŚCI</b>	<b>27</b>
A. PRZEKORA, K. WÓJTOWICZ, G. GINALSKA	

<b>MODYFIKACJA WARSTWY WIERZCHNIEJ FOSFORANÓW WAPNIA POLIMERAMI BIODEGRADOWALNYMI</b>	<b>29</b>
M. SZUBERT, K. ADAMSKA, A. VOELKEL, T. BUCHWALD, M. SZYBOWICZ	

<b>KSZTAŁTOWANIE SUPER-SPRĘŻYSTYCH SPRĘŻYN NiTi DO PLASTYKI CZASZKI</b>	<b>33</b>
Z. LEKSTON	

<b>OCENA WPŁYWU PROMIENIOWANIA UV NA KOLAGEN RYBI METODAMI SPEKTROSKOPOWYMI</b>	<b>37</b>
J. KOZŁOWSKA, A. SIONKOWSKA	

<b>POWŁOKI PARYLENOWE DO OCHRONY POWIERZCHNI METALOWYCH IMPLANTÓW</b>	<b>39</b>
M. CIEŚLIK, M. GOŁDA, A. KOTARBA	

<b>CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI UŻYTKOWYCH STOPU MAGNEZU Z POWŁOKĄ HYDROKSYAPATYTOWĄ</b>	<b>42</b>
A. DUDEK, M.A. MALIK	

<b>ANALIZA ZMIAN W EKSPRESJI GENÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO W KOMÓRKACH OSTEOBLASTÓW HODOWANYCH NA POWIERZCHNIACH STOPÓW TYTANU</b>	<b>46</b>
M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO, P. KOMOROWSKI, W. JAKUBOWSKI, L. KLIMEK, B. WALKOWIAK	

<b>METODA WYTWARZANIA KOMPOZYTÓW METALICZNO-CERAMICZNYCH Ti+HAp I JEJ WPŁYW NA WŁASNOŚCI STRUKTURALNE</b>	<b>48</b>
M. KLIMAS, A. DUDEK	

<b>USZLACHETNIANIE POWIERZCHNI STOPU TYTANU Ti6Al4V ELI</b>	<b>52</b>
J. KLIMAS, A. DUDEK, M. KLIMAS	

<b>ZŁOŻONY UKŁAD WOLNYCH RODNIKÓW W STERYLIZOWANYCH TERMICZNIE LEKACH GLIKOKORTYKOSTEROIDOWYCH</b>	<b>55</b>
M. KOŚCIELNIAK, B. PIŁAWA	

<b>BADANIA BIOZGODNOŚCI IN VITRO POLIMERÓW KONSTRUKCYJNYCH POMPY WSPOMAGANIA SERCA RELIGA HEART EXT, PODDANYCH PROCESOWI PRZETWÓRSTWA</b>	<b>57</b>
M. KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK, P. WILCZEK, R. KUSTOSZ, M. GONSIOR	

<b>INFRARED SPECTROSCOPY AND NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE MEASUREMENTS OF WATER AND HYDROXYL GROUPS IN NANOCRYSTALLINE HYDROXYAPATITES</b>	<b>22</b>
L. PAJCHEL, K. MARKOWSKA, W. KOŁODZIEJSKI	

<b>PLASMA ENHANCED AEROSOL-GEL DEPOSITION OF CERAMIC COATINGS</b>	<b>24</b>
B. PIETRZYK, S. MISZCZAK, H. SZYMANOWSKI, Z. GAWRONSKI	

<b>THE BIOCOMPATIBILITY ASSESSMENT OF CHITOSAN-BASED COMPOSITES FOR BONE TISSUE ENGINEERING</b>	<b>27</b>
A. PRZEKORA, K. WÓJTOWICZ, G. GINALSKA	

<b>SURFACE MODIFICATION OF CALCIUM PHOSPHATES BY BIODEGRADABLE POLYMERS</b>	<b>29</b>
M. SZUBERT, K. ADAMSKA, A. VOELKEL, T. BUCHWALD, M. SZYBOWICZ	

<b>FORMING OF SUPERELASTIC NiTi SPRINGS FOR CRANIOPLASTY</b>	<b>33</b>
Z. LEKSTON	

<b>SPECTROSCOPIC STUDIES INTO THE INFLUENCE OF UV RADIATION ON FISH COLLAGEN</b>	<b>37</b>
J. KOZŁOWSKA, A. SIONKOWSKA	

<b>PARYLENE COATING FOR METAL IMPLANT SURFACE PROTECTION</b>	<b>39</b>
M. CIEŚLIK, M. GOŁDA, A. KOTARBA	

<b>CHARACTERISTICS OF UTILIZABLE PROPERTIES OF MAGNESIUM ALLOY WITH THE HYDROXYAPATITE COATING</b>	<b>42</b>
A. DUDEK, M. MALIK	

<b>ANALYSIS OF CHANGES IN CELL CYCLE GENE EXPRESSION IN OSTEOBLASTS CULTURED ON THE SURFACES OF TITANIUM ALLOYS</b>	<b>46</b>
M. WALKOWIAK-PRZYBYŁO, P. KOMOROWSKI, W. JAKUBOWSKI, L. KLIMEK, B. WALKOWIAK	

<b>METHOD OF OBTAINING METALLIC-CERAMIC COMPOSITES OF Ti + HAP AND ITS EFFECT ON STRUCTURAL PROPERTIES</b>	<b>48</b>
M. KLIMAS, A. DUDEK	

<b>SURFACE REFINEMENT OF TITANIUM ALLOY Ti6Al4V ELI</b>	<b>52</b>
J. KLIMAS, A. DUDEK, M. KLIMAS	

<b>COMPLEX FREE RADICALS SYSTEM IN THERMALLY STERILIZED GLUCO- CORTICOSTEROIDES</b>	<b>55</b>
M. KOŚCIELNIAK, B. PIŁAWA	

<b>BIOCOMPATIBILITY IN VITRO INVESTIGATIONS OF RELIGA HEART EXT VENTRICULAR ASSIST DEVICE STRUCTURAL POLYMERS, TREATED WITH TECHNOLOGICAL PROCESS</b>	<b>57</b>
M. KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK, P. WILCZEK, R. KUSTOSZ, M. GONSIOR	



## NAPEŁNIACZE WSPOMAGAJĄCE PROCES FOTO-BIO-DEGRADACJI MEDYCZNYCH ODPADÓW POLIMEROWYCH 62

A. SOBCZYK-GUZENDA, M. KACZMAREK, J. GRZYWACZ,  
H. SZYMANOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN, B. WOŹNIAK

## PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH BIODEGRADOWALNYCH KOMPOZYTÓW PODWÓJNYCH I POTRÓJNYCH NA OSNOWIE PCL 66

K. KORZEB, J. IDASZEK, W. ŚWIĘSZKOWSKI

## SUPERSPRĘŻYSTE ZACHOWANIE DRUTÓW NiTi PODCZAS ZGINANIA 69

Z. LEKSTON, P. LACKI

## OCENA BIOAKTYWNOŚCI DWUFAZOWYCH MATERIAŁÓW IMPLANTACYJNYCH NA BAZIE FOSFORANÓW WAPNIA I PÓŁWODNEGO SIARCZANU (VI) WAPNIA 73

D. SIEK, A. ZIMA, Z. PASZKIEWICZ, A. ŚLÓSARCZYK

## STERYLIZACJA RADIACYJNA BIORESORBO- WALNYCH KOPOLIMERÓW ZAWIERAJĄCYCH LEK CYTOSTATYCZNY 74

M. MUSIAŁ-KULIK, K. GĘBAROWSKA, H. JANECZEK, M. PASTUSIAK,  
J. KASPERCZYK, P. DOBRZYŃSKI

## WYTWARZANIE POROWATYCH RUSZTOWAŃ Z POLI(3-HYDROKSYMAŚLANU-KO-3-HYDROKSY- WALERIANU) ZA POMOCĄ TECHNIKI SZYBKIEGO PROTOTYPOWANIA 79

Ż. KUBLIK, J. IDASZEK, W. ŚWIĘSZKOWSKI

## MODYFIKACJA POWIERZCHNI TYTANU METODAMI PLAZMOCHEMICZNYMI 82

M. JANUŚ, J. KONEFAŁ-GÓRAL, A. MAŁEK, S. KLUSKA, S. JONAS

## MINERALIZACJA ENZYMATYCZNA KOMPO- ZYTÓW BIOSZKŁO/GUMA GELLAN 85

M. PILARZ, W. PIWOWARCZYK, G. KRAWCZYK, K. CHOLEWA-KOWALSKA,  
T.E.L. DOUGLAS, E. PAMUŁA

## BIOLOGICZNA OCENA WARSTW WĘGLOWYCH DOMIESZKOWANYCH SREBREM 89

W. JAKUBOWSKI, P. KOMOROWSKI, D. BOCIAGA, D. BATORY,  
P. NIEDZIELSKI, B. WALKOWIAK

## OCENA CYTOZGODNOŚCI IN VITRO CERAMICZNYCH SUBSTYTUTÓW TKANKI KOSTNEJ OPARTYCH NA $\alpha$ -TCP 90

M. NOGA, R. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ, D. SIEK,  
J. CZECHOWSKA, A. ZIMA, A. ŚLÓSARCZYK

## WPŁYW WARUNKÓW HODOWLI IN VITRO NA PRZEŻYWALNOŚĆ LUDZKICH KOMÓREK KOSTNYCH W KONTAKCIE Z MATERIAŁAMI CERAMICZNYMI 92

R. OLKOWSKI, P. KASZCZEWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ,  
J. CZECHOWSKA, D. SIEK, D. PIJOCHA, A. ŚLÓSARCZYK

## WPŁYW MODYFIKACJI WARUNKÓW EKSPERYMENTALNYCH NA HODOWLĘ LUDZKICH KOMÓREK OSTEOGENNYCH NA MIKROPOROWATEJ BIOCERAMICE HYDROKSYAPATYTOWEJ 93

M. KOŁODZIEJCZYK-MIERZYŃSKA, A. CHRÓŚCICKA, Z. PASZKIEWICZ,  
A. ZIMA, A. ŚLÓSARCZYK, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

## FILLERS ENHANCING PHOTO-BIODEGRADATION OF MEDICAL POLYMER WASTES 62

A. SOBCZYK-GUZENDA, M. KACZMAREK, J. GRZYWACZ,  
H. SZYMANOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN, B. WOŹNIAK

## COMPARISON OF MECHANICAL PROPERTIES OF BIODEGRADABLE PCL-BASED BINARY AND TERNARY COMPOSITES 66

K. KORZEB, J. IDASZEK, W. ŚWIĘSZKOWSKI

## SUPERELASTIC BEHAVIOR OF NiTi WIRES IN BENDING 69

Z. LEKSTON, P. LACKI

## EVALUATION OF BIOACTIVITY OF BIPHASIC IMPLANT MATERIALS BASED ON THE CALCIUM PHOSPHATES AND CALCIUM SULFATE HEMIHYDRATE 73

D. SIEK, A. ZIMA, Z. PASZKIEWICZ, A. ŚLÓSARCZYK

## RADIATION STERILIZATION OF BIORESORBABLE COPOLYMERS WITH THE CYTOSTATIC DRUG 74

M. MUSIAŁ-KULIK, K. GĘBAROWSKA, H. JANECZEK, M. PASTUSIAK,  
J. KASPERCZYK, P. DOBRZYŃSKI

## FABRICATION OF POROUS POLY (3-HYDROXY- BUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) SCAFFOLDS USING A RAPID PROTOTYPING TECHNIQUE 79

Ż. KUBLIK, J. IDASZEK, W. ŚWIĘSZKOWSKI

## SURFACE MODIFICATION OF TITANIUM WITH PLASMOCHEMICAL METHODS 82

M. JANUŚ, J. KONEFAŁ-GÓRAL, A. MAŁEK, S. KLUSKA, S. JONAS

## ENZYMATIC MINERALIZATION OF BIOGLASS / GELLAN GUM COMPOSITES 85

M. PILARZ, W. PIWOWARCZYK, G. KRAWCZYK, K. CHOLEWA-KOWALSKA,  
T.E.L. DOUGLAS, E. PAMUŁA

## BIOLOGICAL EVALUATION OF CARBON LAYERS DOPED WITH SILVER 89

W. JAKUBOWSKI, P. KOMOROWSKI, D. BOCIAGA, D. BATORY,  
P. NIEDZIELSKI, B. WALKOWIAK

## EVALUATION OF IN VITRO CYTOCOMPATIBILITY OF CERAMIC BONE SUBSTITUTES BASED ON $\alpha$ -TCP 90

M. NOGA, R. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ, D. SIEK,  
J. CZECHOWSKA, A. ZIMA, A. ŚLÓSARCZYK

## CONDITIONS OF IN VITRO CULTURE INFLUENCE THE VIABILITY OF HUMAN BONE CELLS CULTURED WITH CERAMIC MATERIALS 92

R. OLKOWSKI, P. KASZCZEWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ,  
J. CZECHOWSKA, D. SIEK, D. PIJOCHA, A. ŚLÓSARCZYK

## EFFECT OF MODIFICATION OF EXPERIMENTAL CONDITIONS ON THE CULTURE OF HUMAN OSTEOGENIC CELLS ON MICROPOROUS HYDROXYAPATITE BIOCERAMIC 93

M. KOŁODZIEJCZYK-MIERZYŃSKA, A. CHRÓŚCICKA, Z. PASZKIEWICZ,  
A. ZIMA, A. ŚLÓSARCZYK, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

# MINERALIZACJA ENZYMATYCZNA HYDROŻELI Z GUMY GELLAN Z WYTWORZENIEM FOSFORANÓW WAPNIA ORAZ MAGNEZU DLA INŻYNIERII TKANKI KOSTNEJ 95

T.E.L. DOUGLAS, G.KRAWCZYK, E.PAMULA, H.A. DECLERCQ, D. SCHAUBROECK, M.M. BUCKO, L. BALCAEN, P. VAN DER VOORT, F. VANHAECKE, R. CORNELISSEN, P. DUBRUEL

# MOŻLIWOŚCI APLIKACYJNE MODYFIKOWANYCH PROSZKÓW WĘGLOWYCH W PRZEMYSŁE FARMACEUTYCZNO-KOSMETYCZNYM 99

B. SKIBSKA, K.H. BODEK, M. BATORY

# MODYFIKOWANE PREKURSOROWE WŁÓKNA POLIAKRYLONITRYLOWE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH 100

M. BRZEZIŃSKA, P. KRÓL, M. BOGUŃ

# TESTY POTENCJODYNAMICZNE DRUTÓW STALOWYCH PRZEZNACZONYCH DLA KARDIOLOGII 104

J. PRZONDZIOŃ, W. WALKE, M. FILIPEK, P. WRONA

# INFLUENCE ON THE TYPE OF MATERIALS OF THE FRICTION PAIR ON THE WEAR MECHANISM OF SPINAL INTERVERTEBRAL DISK IMPLANTS 109

M. GIERZYŃSKA-DOLNA, M. LIJEWSKI, J. WENDLAND

# POLY(E-CAPROLACTONE) AS POTENTIAL MATERIAL FOR CATHETERS TO XENOGENEIC TRANSPLANTATIONS AND EMBRYOLOGIC DEVICES 111

E. STODOLAK-ZYCH, J. WIECZOREK, U. PARA

# RESORBABLE SCAFFOLDS MODIFIED WITH COLLAGEN TYPE I OR HYDROXYAPATITE: IN VIVO STUDIES ON RABBITS 115

E. PAMUŁA, M. ORZELSKI, P. MALISZ, Ł. RUMIAN, E. MENASZEK, B. NOWAK, P. DOBRZYŃSKI, P. SILMANOWICZ

# EVALUATION OF REPAIR OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS IN RABBITS USING NEW COMPOSITE BIOMATERIALS DURING THREE-MONTH OBSERVATION 118

B. ŻYLIŃSKA, E. STODOLAK-ZYCH, K. NOWICKA, P. SILMANOWICZ

# INFLUENCE OF SURFACE TOPOGRAPHY AND MORPHOLOGY OF PU/PLA FILMS ON FIBROBLASTS PERFORMANCE 120

P. BEDNARZ, M. KROK, J. LASKA

# PERSONALIZED MEDICINE USING POLYMERS: UTOPIA OR REALITY? 123

P. DUBRUEL, T. DESMET, S. VAN VLIERBERGHE, O. MUSIAL, R. CORNELISSEN, H. DECLERCQ, E. BERNEEL

# POROUS PLURONIC-BASED SCAFFOLDS: AN ATTRACTIVE CONCEPT TOWARDS TISSUE REGENERATION 124

M. VANDENHAUTE, E. GEVAERT, R. CORNELISSEN, C. VERFAILLIE, P. DUBRUEL

# GELATIN AS A VERSATILE HYDROGEL BUILDING BLOCK: ONE POLYMER, MANY APPLICATIONS 125

O. MUSIAL, S. VAN VLIERBERGHE, T. BILLIET, F. FERREIRA, E. VANDERLEYDEN, R. CORNELISSEN, H. DECLERCQ, J. SCHROOTEN, R. UNGER, J. KIRKPATRICK, P. DUBRUEL

# ENZYMATIC MINERALIZATION OF GELLAN GUM HYDROGELS WITH CALCIUM AND MAGNESIUM PHOSPHATE FOR BONE TISSUE ENGINEERING 95

T.E.L. DOUGLAS, G.KRAWCZYK, E.PAMULA, H.A. DECLERCQ, D. SCHAUBROECK, M.M. BUCKO, L. BALCAEN, P. VAN DER VOORT, F. VANHAECKE, R. CORNELISSEN, P. DUBRUEL

# POSSIBILITIES OF APPLICATION OF MODIFIED CARBON POWDERS INTO PHARMACEUTICAL AND COSMETIC INDUSTRIES 99

B. SKIBSKA, K.H. BODEK, M. BATORY

# MODIFIED PRECURSOR POLYACRYLONITRILE FIBRES FOR MEDICAL APPLICATIONS 100

M. BRZEZIŃSKA, P. KRÓL, M. BOGUŃ

# POTENTIODYNAMIC TESTS OF STEEL WIRES FOR CARDIOLOGY 104

J. PRZONDZIOŃ, W. WALKE, M. FILIPEK, P. WRONA

# INFLUENCE ON THE TYPE OF MATERIALS OF THE FRICTION PAIR ON THE WEAR MECHANISM OF SPINAL INTERVERTEBRAL DISK IMPLANTS 109

M. GIERZYŃSKA-DOLNA, M. LIJEWSKI, J. WENDLAND

# POLY(E-CAPROLACTONE) AS POTENTIAL MATERIAL FOR CATHETERS TO XENOGENEIC TRANSPLANTATIONS AND EMBRYOLOGIC DEVICES 111

E. STODOLAK-ZYCH, J. WIECZOREK, U. PARA

# RESORBABLE SCAFFOLDS MODIFIED WITH COLLAGEN TYPE I OR HYDROXYAPATITE: IN VIVO STUDIES ON RABBITS 115

E. PAMUŁA, M. ORZELSKI, P. MALISZ, Ł. RUMIAN, E. MENASZEK, B. NOWAK, P. DOBRZYŃSKI, P. SILMANOWICZ

# EVALUATION OF REPAIR OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS IN RABBITS USING NEW COMPOSITE BIOMATERIALS DURING THREE-MONTH OBSERVATION 118

B. ŻYLIŃSKA, E. STODOLAK-ZYCH, K. NOWICKA, P. SILMANOWICZ

# INFLUENCE OF SURFACE TOPOGRAPHY AND MORPHOLOGY OF PU/PLA FILMS ON FIBROBLASTS PERFORMANCE 120

P. BEDNARZ, M. KROK, J. LASKA

# PERSONALIZED MEDICINE USING POLYMERS: UTOPIA OR REALITY? 123

P. DUBRUEL, T. DESMET, S. VAN VLIERBERGHE, O. MUSIAL, R. CORNELISSEN, H. DECLERCQ, E. BERNEEL

# POROUS PLURONIC-BASED SCAFFOLDS: AN ATTRACTIVE CONCEPT TOWARDS TISSUE REGENERATION 124

M. VANDENHAUTE, E. GEVAERT, R. CORNELISSEN, C. VERFAILLIE, P. DUBRUEL

# GELATIN AS A VERSATILE HYDROGEL BUILDING BLOCK: ONE POLYMER, MANY APPLICATIONS 125

O. MUSIAL, S. VAN VLIERBERGHE, T. BILLIET, F. FERREIRA, E. VANDERLEYDEN, R. CORNELISSEN, H. DECLERCQ, J. SCHROOTEN, R. UNGER, J. KIRKPATRICK, P. DUBRUEL



**THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND PORE SIZE ON CELL GROWTH AND PROLIFERATION ON HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS** **127**

D. SOUKUP, M. BACAKOVA, W. PABST, E. GREGOROVA,  
L. BACAKOVA

**POLYLACTIDE NANOFIBERS IN SKIN TISSUE ENGINEERING** **127**

M. BACAKOVA, M. VARGA, T. RIEDEL, D. STRANSKA, L. BACAKOVA

**APPLICATION OF CELLULOSE-BASED BIOMATERIALS IN VASCULAR TISSUE ENGINEERING—A REVIEW AND OUR EXPERIENCE** **128**

L. BACAKOVA, K. NOVOTNA, M. PARIZEK, P. HAVELKA, T. SOPUCH

**POTENTIAL ACTIVATION OF THE IMMUNE SYSTEM ON METALLIC MATERIALS FOR BONE IMPLANTS** **130**

L. STRANAVOVA, M. BACAKOVA, K. NOVOTNA, L. BACAKOVA,  
J. FENCL

**ARTIFICIAL EXTRACELLULAR MATRICES OF COLLAGEN FIBRILS AND LACTOFERRIN AS COATINGS TO ENHANCE OSTEOBLAST BEHAVIOR** **132**

M. VANDROVCOVA, L. BACAKOVA, P. DUBRUEL, T.E.L. DOUGLAS

**ACCELERATION OF GELATION AND PROMOTION OF MINERALIZATION OF CHITOSAN HYDROGELS BY ALKALINE PHOSPHATASE** **135**

T.E.L. DOUGLAS, A. SKWARCZYNSKA, Z. MODRZEJEWSKA,  
L. BALCAEN, D. SCHAUBROECK, S. LYCKE, F. VANHAECHE,  
P. VANDENABEELE, P. DUBRUEL, J.A. JANSEN, S.C.G. LEEUWENBURGH

**COMPOSITES OF POLYVINYL ALCOHOL (PVA) HYDROGEL AND CALCIUM AND MAGNESIUM PHOSPHATE FORMED BY ENZYMATIC FUNCTIONALIZATION** **137**

T.E.L. DOUGLAS, A. PIEGAT, D. SCHAUBROECK, M. EL FRAY,  
P. DUBRUE

**THERMAL BEHAVIOUR OF FUNCTIONALLY GRADED SODIUM-CONTAINING CALCIUM PHOSPHATES** **139**

A. GONCHARENKO, D. ROKHMISTROV, Z. ZYMAN

**POLYLACTIDE – CARBON NANOTUBES NANOCOMPOSITES AS MEMBRANES FOR GUIDED NERVE REGENERATION (GNR)** **139**

E. STODOLAK-ZYCH, A. FRĄCZEK-SZCZYPTA, M. BLĄZEWICZ

**BIOLOGICAL PROPERTY POLY(ε-CAPROLACTONE) AS POTENTIAL MATERIAL FOR REPRODUCTION DEVICES** **140**

J. WIECZOREK, E. STODOLAK-ZYCH, Y. KOSENYUK

**IN VIVO APPLICATION OF FOAM TITANIUM IMPLANTS WITH MAGNESIUM-DOPED OCTACALCIUM PHOSPHATE AND HYDROXYAPATITE THIN FILMS DEPOSITED BY PLD METHOD** **141**

W. MRÓZ B. BUDNER, R. ZAŁĘCZNY, A. PROKOPIUK, K. NIEDZIELSKI,  
A. SŁÓSARCZYK, T.E.L. DOUGLAS, D. SCHARZE

**THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND PORE SIZE ON CELL GROWTH AND PROLIFERATION ON HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS** **127**

D. SOUKUP, M. BACAKOVA, W. PABST, E. GREGOROVA,  
L. BACAKOVA

**POLYLACTIDE NANOFIBERS IN SKIN TISSUE ENGINEERING** **127**

M. BACAKOVA, M. VARGA, T. RIEDEL, D. STRANSKA, L. BACAKOVA

**APPLICATION OF CELLULOSE-BASED BIOMATERIALS IN VASCULAR TISSUE ENGINEERING – A REVIEW AND OUR EXPERIENCE** **128**

L. BACAKOVA, K. NOVOTNA, M. PARIZEK, P. HAVELKA, T. SOPUCH

**POTENTIAL ACTIVATION OF THE IMMUNE SYSTEM ON METALLIC MATERIALS FOR BONE IMPLANTS** **130**

L. STRANAVOVA, M. BACAKOVA, K. NOVOTNA, L. BACAKOVA,  
J. FENCL

**ARTIFICIAL EXTRACELLULAR MATRICES OF COLLAGEN FIBRILS AND LACTOFERRIN AS COATINGS TO ENHANCE OSTEOBLAST BEHAVIOR** **132**

M. VANDROVCOVA, L. BACAKOVA, P. DUBRUEL, T.E.L. DOUGLAS

**ACCELERATION OF GELATION AND PROMOTION OF MINERALIZATION OF CHITOSAN HYDROGELS BY ALKALINE PHOSPHATASE** **135**

T.E.L. DOUGLAS, A. SKWARCZYNSKA, Z. MODRZEJEWSKA,  
L. BALCAEN, D. SCHAUBROECK, S. LYCKE, F. VANHAECHE,  
P. VANDENABEELE, P. DUBRUEL, J.A. JANSEN, S.C.G. LEEUWENBURGH

**COMPOSITES OF POLYVINYL ALCOHOL (PVA) HYDROGEL AND CALCIUM AND MAGNESIUM PHOSPHATE FORMED BY ENZYMATIC FUNCTIONALIZATION** **137**

T.E.L. DOUGLAS, A. PIEGAT, D. SCHAUBROECK, M. EL FRAY,  
P. DUBRUE

**THERMAL BEHAVIOUR OF FUNCTIONALLY GRADED SODIUM-CONTAINING CALCIUM PHOSPHATES** **139**

A. GONCHARENKO, D. ROKHMISTROV, Z. ZYMAN

**POLYLACTIDE – CARBON NANOTUBES NANOCOMPOSITES AS MEMBRANES FOR GUIDED NERVE REGENERATION (GNR)** **139**

E. STODOLAK-ZYCH, A. FRĄCZEK-SZCZYPTA, M. BLĄZEWICZ

**BIOLOGICAL PROPERTY POLY(ε-CAPROLACTONE) AS POTENTIAL MATERIAL FOR REPRODUCTION DEVICES** **140**

J. WIECZOREK, E. STODOLAK-ZYCH, Y. KOSENYUK

**IN VIVO APPLICATION OF FOAM TITANIUM IMPLANTS WITH MAGNESIUM-DOPED OCTACALCIUM PHOSPHATE AND HYDROXYAPATITE THIN FILMS DEPOSITED BY PLD METHOD** **141**

W. MRÓZ B. BUDNER, R. ZAŁĘCZNY, A. PROKOPIUK, K. NIEDZIELSKI,  
A. SŁÓSARCZYK, T.E.L. DOUGLAS, D. SCHARZE

## EVALUATION OF REPAIR OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS IN RABBITS USING NEW COMPOSITE BIOMATERIALS DURING THREE-MONTH OBSERVATION 141

B. ŻYLIŃSKA, E. STODOLAK-ZYCH, K. NOWICKA, P. SILMANOWICZ

## INFLUENCE OF SURFACE AND STRUCTURAL PROPERTIES ON THE INITIAL RELEASE OF RISPERIDONE FROM POLYMERIC DRUG CARRIERS 144

A. TUREK, J. KASPERCZYK, K. JELONEK, P. DOBRZYŃSKI, J. WALICHIEWICZ, K. KRZEMIŃSKA, A. SMOLA, M. MUSIAŁ-KULIK, A. MARCINKOWSKI, M. LIBERA, K. GĘBAROWSKA

## DEGRADATION OF COMPOSITES BASED ON RAW MATERIALS FOR ORTHOPEDIC EQUIPMENT 147

B. SZARANIEC, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, E. STODOLAK-ZYCH

## THE INFLUENCE OF THE DEGRADATION PROCESS ON THE PLA/TCP LOCKING BOLT THREAD STRENGTH AS A PART OF INTRAMEDULLARY LOCKING NAIL SYSTEM 148

K. GRYŃ, B. SZARANIEC, M. ZIĄBKA, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J. CHŁOPEK

## INFLUENCE OF THIN FILMS OF BIOGLASS AND HYDROXYAPATITE MIXTURE DEPOSITED BY PLD METHOD ON BIOACTIVITY OF FOAM TITANIUM IMPLANTS 148

W. MRÓZ, B. BUDNER, R. ZAŁĘCZNY, A. BOMBALSKA, K. NIEDZIELSKI, M. ŁĄCZKA, A. ŚLÓSARCZYK, K. CHOLEWA-KOWALSKA, T.E.L. DOUGLAS, D. SCHWARZE

## THE ADHESION AND GROWTH OF HUMAN OSTEOLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON TITANIUM MODIFIED WITH GOLD MICROPARTICLES AND POLY(ETHYLENE IMINE) 149

M. PARIZEK, T. BASE, M. HRUBY, V. LISA, L. BACAKOVA

## BIOCOMATIBILITY STUDY OF BOC POLYMER MESH ENRICHED WITH HAP AND TCP COVERED BY PCL FIBRES 151

E. MENASZEK, A. ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA, Z. DRACZYŃSKI, M. BOGUN, E. STODOLAK-ZYCH

## IN VITRO STUDIES OF DIFFERENT TYPES OF CARBON NANOTUBES DEPOSITED ON PTFE MEMBRANE 153

A. FRACZEK-SZCZYPTA, E. MENASZEK, M. MIRANOWICZ, S. BLĄZEWICZ

## VANADIUM OXIDE RICH NANOTUBES ON BOTH PHASES OF ANODIZED Ti6Al4V ALLOY 155

A. KACZMAREK, K. ARKUSZ, E. KRASICKA-CYDZIK

## EVALUATION OF REPAIR OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS IN RABBITS USING NEW COMPOSITE BIOMATERIALS DURING THREE-MONTH OBSERVATION 141

B. ŻYLIŃSKA, E. STODOLAK-ZYCH, K. NOWICKA, P. SILMANOWICZ

## INFLUENCE OF SURFACE AND STRUCTURAL PROPERTIES ON THE INITIAL RELEASE OF RISPERIDONE FROM POLYMERIC DRUG CARRIERS 144

A. TUREK, J. KASPERCZYK, K. JELONEK, P. DOBRZYŃSKI, J. WALICHIEWICZ, K. KRZEMIŃSKA, A. SMOLA, M. MUSIAŁ-KULIK, A. MARCINKOWSKI, M. LIBERA, K. GĘBAROWSKA

## DEGRADATION OF COMPOSITES BASED ON RAW MATERIALS FOR ORTHOPEDIC EQUIPMENT 147

B. SZARANIEC, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, E. STODOLAK-ZYCH

## THE INFLUENCE OF THE DEGRADATION PROCESS ON THE PLA/TCP LOCKING BOLT THREAD STRENGTH AS A PART OF INTRAMEDULLARY LOCKING NAIL SYSTEM 148

K. GRYŃ, B. SZARANIEC, M. ZIĄBKA, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J. CHŁOPEK

## INFLUENCE OF THIN FILMS OF BIOGLASS AND HYDROXYAPATITE MIXTURE DEPOSITED BY PLD METHOD ON BIOACTIVITY OF FOAM TITANIUM IMPLANTS 148

W. MRÓZ, B. BUDNER, R. ZAŁĘCZNY, A. BOMBALSKA, K. NIEDZIELSKI, M. ŁĄCZKA, A. ŚLÓSARCZYK, K. CHOLEWA-KOWALSKA, T.E.L. DOUGLAS, D. SCHWARZE

## THE ADHESION AND GROWTH OF HUMAN OSTEOLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON TITANIUM MODIFIED WITH GOLD MICROPARTICLES AND POLY(ETHYLENE IMINE) 149

M. PARIZEK, T. BASE, M. HRUBY, V. LISA, L. BACAKOVA

## BIOCOMATIBILITY STUDY OF BOC POLYMER MESH ENRICHED WITH HAP AND TCP COVERED BY PCL FIBRES 151

E. MENASZEK, A. ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA, Z. DRACZYŃSKI, M. BOGUN, E. STODOLAK-ZYCH

## IN VITRO STUDIES OF DIFFERENT TYPES OF CARBON NANOTUBES DEPOSITED ON PTFE MEMBRANE 153

A. FRACZEK-SZCZYPTA, E. MENASZEK, M. MIRANOWICZ, S. BLĄZEWICZ

## VANADIUM OXIDE RICH NANOTUBES ON BOTH PHASES OF ANODIZED Ti6Al4V ALLOY 155

A. KACZMAREK, K. ARKUSZ, E. KRASICKA-CYDZIK



# CERAMIC FOR RESTORATION DENTISTRY

L.I. PODZOROVA\*, A.A. IL'ICHEVA, N.A. MIKHAILINA,  
O.I. PEN'KOVA, L.I. SHVORNEVA, V.A. VOLCHENKOVA,  
S.V. KUTHEV

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES,  
BAIKOV INSTITUTE OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCE,  
49 LENINISKI STR., 119991 MOSCOW, RUSSIA  
\*MAILTO: PODZOROVA@POCHTA.RU

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 1-2]

## Introduction

A ceramic based on Yttrium-Tetragonal Zirconia Polycrystal (Y-TZP) has bio-compatibility and matters as advanced material for restoration dentistry [1]. However, the implant of Y-TZP ceramics demonstrates a significant failure. This is explained by the instability caused by low-temperature aging degradation (LTAD), taking place in the aqueous solutions of Y-TZP zirconia ceramics.

There is the reduction of impact of Y-TZP ceramic low-temperature "aging," showing itself in instability of mechanical parameters. Several ways of improving Y-TZP ceramic characteristics were proposed.

It is well known that "stability" of such materials increases when grains smaller than 800 nm are in the microstructure and in the presences other stabilizer except for  $Y^{+3}$ .

An alternative to Y-TZP ceramics is a Ce-TZP ceramics, which resists to LTAD and has high parameters of durability. Unfortunately, the bending strength of the Ce-TZP ceramics could not reach the values of Y-TZP ceramics.

The object of this work: changing stabilizer  $Y^{+3}$  for obtaining ceramic materials with high parameters of purity and possess a thin microstructure and adequate sanitary-chemical requirements for materials used for medical purposes.

## Experimental procedure

Source powders for ceramic materials were obtained on the basis of compositions where  $ZrO_2$  is stabilized by  $CeO_2$  and  $Yb_2O_3$  in tetragonal modification.

The powder precursors were obtained by hydrosol version of the sol-gel process in presence of polyvinyl alcohol and isobutanol as the complex surface-active substances under simultaneous component precipitation. A concentrated solution of aqueous ammonia was used as a precipitant. Gel-like precipitates were dried, then obtained xerogel was heat treated and sintered [2].

## Research and control methods

The ultimate composition of the precursor was determined on the basis of the technique of atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma using an ULTIMA-2 spectrometer of the JOBIN YVON HORIBA

Company (France-Japan). The relative standard deviation ( $S_r$ ) for different elements did not exceed 0.025.

To measure the powder surface area, a low-temperature adsorption technique was used (TriStar-3000 adsorptive-structural analyzer, Micromeritics, USA).

Qualitative analysis of samples was carried out means of an XRD-6000 diffractometer (Shimadzu) on radiation  $CuK_{\alpha}$   $\lambda = 1.54$  Å in the interval of angles  $2\theta = 26^\circ - 65^\circ$  with scanning step of  $0.02^\circ$  and identification according to international standard bank (JCPDS).

Ceramic relative density and void structure was determined by means of hydrostatic weighing.

Ultimate bending strength and crack strength were determined by the three-point bending technique on a Instron 5581 universal testing machine.

Scanning electron microscope "LEO1420" and atomic force microscope "NEXT" were used to study the microstructure of the ceramics.

The instability caused by low-temperature aging degradation (LTAD), was tested in the hot aqueous solutions within 7 hours that is equivalent to 20 years of stay implant in an alive body.

## Results

The content of these powders is represented by the only main crystal phase, which corresponds to a solid solution based on  $T-ZrO_2$ .

We obtained ceramic materials based on synthesized powders with a specific density 99% than the theoretical one.

According to electron microscopy of the obtained ceramic materials, average grain sizes vary from 400 to 200 nm. It benefits the increasing the stability at low temperature aging. The results of AFM study reveal the structure is traced on all volume of a sample and is submitted of fine grains separate from each other is without the large connections of borders, which could create of a crack in microstructure. The microstructure of ceramic stabilized by  $Yb_2O_3$  is shown at FIG.1.

A longitudinal and cross speeds of a sound were measured at samples ceramics, accordingly, 6800-6700 m/c and 3600- 3700 m/c.

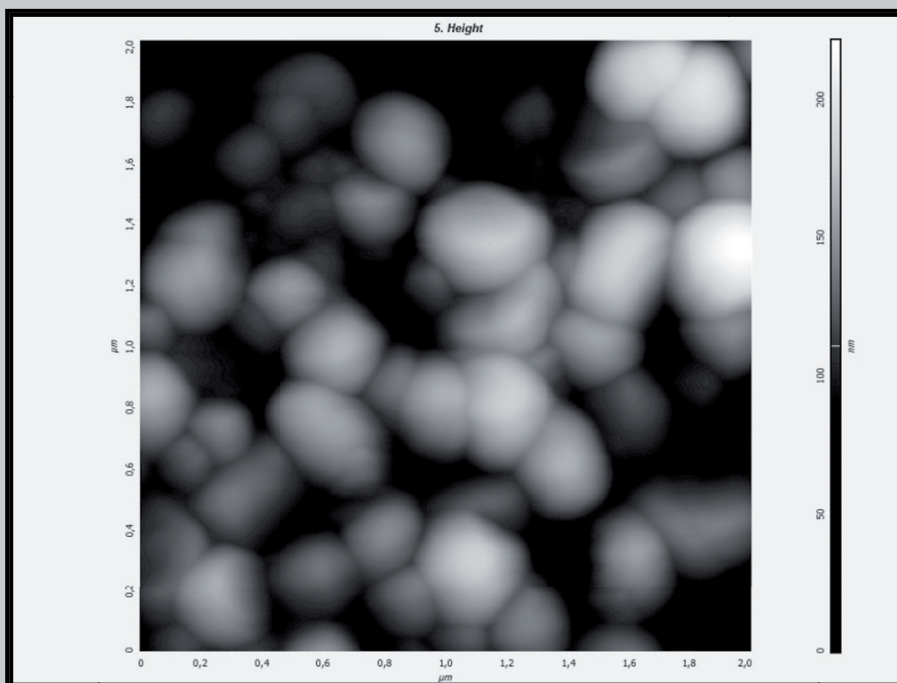


FIG. 1. The images of ceramic with  $Yb_2O_3$  obtained by AFM.

TABLE 1. Residual element content in precursors by Yb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Element	Content [wt %]
Hf	1,2
Al	0,25
Ca	~0,01
Fe	< 0,01
Na	< 0,01
Ba	< 0,001

The ultimate bending strength of ceramics stabilized by CeO<sub>2</sub> and Yb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> remained without changes after aging in hot water environment.

The quantity of residual elements in the synthesized powders is insignificant; its qualitative composition is not dangerous to health. As TABLE 1 shows, among residual elements, the content of Hf is the maximal one, which is an inseparable residual element of Zr.

Investigation of subacute toxicity was carried out in conditions where white mice intragastrically repeatedly received ceramic extracts. During the whole observation period, there were no cases of test animal death or changes in appearance, behavior, eating, and physical activity compared to control group. The toxicity index was 98% with the standard value from 70 to 120%. Sample extracts did not show any hemolytic action in experiments in vitro with isolated erythrocytes of rabbits: hemolysis was 0% with the permissible value less than 2%.

Ceramics based on T-ZrO<sub>2</sub> stabilized by CeO<sub>2</sub> and Yb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> are nontoxic, meets the requirements of standardized documentation, and can be applied as a material for medical purposes.

## Acknowledgements

*We are grateful to S. Berezina (University of Žilina, Slovakia) for obtaining the electron micrographs of the microstructure of the ceramic samples.*

## References

- [1]. Piconi C., Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial// Biomaterials -1999, pp 1-25.
- [2]. N.A. Mikhailina, L.I. Podzorova, M.N. Romyantseva, L.I. Shvorneva, O.A. Ceramic on the basis of Tetragonal Zirconium dioxide for restoration dentistry// Inorganik Materials: Applied Research, 2010, Vol. 1, No. 4, pp. 335-338.

# COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE PREPARATIONS "BIOSITAL" AND "KAFAM" INFLUENCE COMBINED WITH ELECTROACUPUNCTURE ON THE HEALING OF ALVEOLAR PROCESSES OF THE MAXILLA BONES IN EXPERIMENT

POHODENKO-CHUDAKOVA I.O.\*, CHUDAKOV O.P., PETCHURSKIY A.I.

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,  
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER FOR EUROPEAN ASSOCIATION FOR CRANION-MAXILLOFACIAL SURGERY, MINSK  
ADVISORY AND DIAGNOSTIC CENTER, MINSK, BELARUS  
9 KOSMONAVTOV STR., PO Box 286., 220025, MINSK, REPUBLIC OF BELARUS,  
\*MAILTO: IP-C@YANDEX.RU

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 2-3]

## Introduction

It's well known that special care rendering by stomatological health authorities is in great demand. Bone defects left in the maxilla bones after the healing of chronic odontogenic infection focuses, treatment of non-cancerous growth after the implants extraction considerably reduce the maxilla bone strength and worsen conditions of the tooth system functioning, provoke disturbance of the chewing function what has negative influence on the human body state [1,5]. Thus, development and introduction into the clinical practice of the new complex methods of patients rehabilitation with bone defects of alveolar processes allowing effective recovery and reconstruction of the injured tissues and remain the main direction in maxillofacial surgery and stomatology.

Toxico-hygienic examinations of «Biosital» and «Kafam» preparations made before, demonstrated that they have bioactive characteristics due to the calcium and phosphorus migration from the surfaces of these materials when contacting with the blood plasma which cause there high osteogenic indices. There are scientific medical works confirming the positive effects of electroacupuncture on the processes of bone modeling [4]. But the range of morphological aspects of the complex interaction of mentioned above osteotropic medicines with biological tissues during the acupuncture treatment is not yet studied and examined actually.

Aim of the work was to make comparative evaluation of the preparations «Biosital», «Kafam» influence and electroacupuncture treatment with electronic device «Vityaz AET-01» in skin projection of acupoints on the process of the alveolar sockets healing after the teeth extraction on the lower jaw in experiment according to the clinic macroscopic visual evaluation data.

## Objects and methods

Examination was performed according to the Regulations for experiments on animals [2]. Experiment was done on 45 sexually mature males of Shinshila rabbits of the same age and weight. All animals were divided into 5 series, 9 animals in every one. The first series was the control one. Animals of this series had operation for the central incisor extrac-

tion on the lower jaw and the alveolar sockets were filled in with blood clot after operation. Alveolar sockets of the second series animals were filled in with bioactive materials «Biosital» mixed with the animal blood. Alveolar sockets of the third series animals were filled in with bioactive materials «Kafam». Alveolar sockets of the forth and fifth series were filled in with «Biosital» and «Kafam» medicines with postoperative electroacupuncture treatment, 10 sessions. We irritated acupoints similar with GI4, E36, VB20, VG26 for a man determined according to the information about acupuncture application in veterinary [3]. Total treatment lasted 15 minutes.

Effectiveness of complex application of «Biosital», «Kafam» and electroacupuncture was determined according to the dynamic supervision indices on the postoperative wounds state on the 3, 7, 14, 21, 30 days, 1,5, 2, 3 and 6 months postoperatively.

## Results

Postoperative inflammatory reactions in the region of the alveolar socket of the extracted teeth of the series 1-3 demonstrated that animals had pronounced edema and hyperemia of the mucous tunic on the region of the wound sutures on the third day after operation.

In the series 4 and 5 the edema was insignificant by the same term, the mucous tunic of the postoperative wound was pink-pale, the sutures were intact.

The edema of the mucous tunic of alveolar processes of the lower jaw remained for the animals of the series 1, 2, 3, 4 by the 7 day in the region of the alveolar socket. The socket with the blood clot was filled in by the granulation substance in the third. Granulation tissue covered the implantation material. At the same time, the 4-Series had a slight hyperemia of the mucous tunic in the region of sutures, in the 5 Series the mucous tunic was pink-pale and swelling and hyperemia were absent.

On the 14th day of observation in the animals of the 1st series we stated fragmentation remains of blood clot in the sockets of the extracted teeth. In the 2nd series the granulated preparation «Kafam» appeared in the form of small rounded conglomerates alternating with organizing granulation tissue. In the 3rd series the implantation materials were visualized in the form of individual large dense fragments of polygonal shapes, closely adjacent to the walls of the alveoles. In individuals of the 4th and 5th series we registered the visual scar absence, its boundaries could not be determined during palpation.

On the 21th day the animals of the 1st series had no signs of inflammation and fistulas in the mucous tunic in the surgical wound. In the 2nd series the mucous tunic of the alveolar process was without changes and deformation. It should be noted that the aesthetic indices of scars for animals of third series was significantly higher with respect to the Series 1 and 2. In the 4th, 5th series the mucous tunic in the postoperative wound region was pink-pale pink without visible changes. During the detailed study of the macropreparations, the clumps of granules separated by strands of young regenerate bone of gray color were fixed in 4-Series. In the 5-series the regenerated bone was gray and clearly visualized throughout.

After 30 days of observation in the animals of the 1st series the mucous tunic in the region of socket of extracted tooth had a physiological color. Visually we determined a significant reduction in the height of alveolar socket in extracted tooth region. In the 2nd, 3rd series of swelling of the mucous tunic in the region of extracted tooth was absent, the height reducing in the alveole region of the extracted incisor was

not observed. Examination of macropreparations in the 4th and 5th series showed that the wells are made of dense fibrous tissue in the upper, granulation «Kafam» and «Biosital» is not found. Degradation signs were not determined.

## Conclusion

Analysis of the results provides a basis to conclude that the complex application of the implant preparations «Kafam» and «Biosital» combined with electroacupuncture in experiment has positive affects on the processes of their osteoregeneration of acquired defects of the alveolar processes of the lower jaw.

## References

- [1] Chudakov O.P. et al. Biosital and its forms in maxilla-facial surgery, Abstrakt XVII Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-facial Surgery. – Tours: 167, 2004.
- [2] Denissov S.D., Morozkina T.S. Requirements to the scientific experiment on the animals, Zdravooohranenie: 4, 40-42, 2001.
- [3] Longo F., Gazzola M. Scientific basis of veterinary acupuncture, Abstract book. XV World congress on medical acupuncture (25-27 may 2012, Athens, Greece): 39-40, 2012.
- [4] Pashkevich L.A., Pohodenko-Chudakova I.O., Shevela T.L. Acupuncture influence on the processes of osteointegration in the system mandibula – dental implant by morphological examinations data, Medical Journal: 3 (37), 109-112, 2011.
- [5] Ulyanova T.M. et al. Application of the new bone-replaeng material «Kafam» in stomatology, Engeneering of biomaterials – Cracow: 12-13, 2004.



## COMPARATIVE CHARACTERISTICS FOR POSTOPERATIVE BONE WOUNDS HEALING AFTER «DENTAL ADGESIVE PASTE SOLKOSERYL» AND COLLAGENOUS SPONGE «GELOPACK» APPLICATION IN TRETMENT

E.A. AVDEEVA, E.V.SAVITZKAYA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA\*

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,  
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER FOR EUROPEAN ASSOCIA-  
TION FOR CRANION-MAXILLOFACIAL SURGERY, MINSK  
ADVISORY AND DIAGNOSTIC CENTER, MINSK, BELARUS  
9 KOSMONAVTOV STR., PO Box 286., 220025, MINSK,  
REPUBLIC OF BELARUS,  
\*MAILTO: IP-C@YANDEX.RU

*[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 4]*

### Introduction

The operation for tooth extraction is the most common in the practice of a surgeon-dentist. After extraction, the formed bone wound is filling with blood and a blood clot is formed which is a biological barrier that protects the socket from mechanical damage and infection. Normally the socket epithelialization is forming 7-10 days after the extraction [1].

Tooth extraction can be traumatic in case of the anomalous position of the tooth or when the tooth crown is significantly destructed. As a result, such complication as alveolitis is developing - inflammation of the alveolar socket walls of the extracted tooth [3].

A large number of publications are devoted to the optimization of the alveolar socket healing using a variety of drugs, but the question of the atypical tooth extraction is studied insufficiently [2,3].

Aim was to compare the dynamics of bone healing of wounds after surgery of atypical tooth extraction when the alveolar socket filled with blood clot with additional fixation with a blood clot with drug «Dental adhesive paste Solcoseryl» and use of collagen sponge «Gelopack» the with the same purpose.

### Objects and methods

We observed 15 patients without concomitant somatic pathology who underwent surgery for atypical tooth extraction. Patients were divided into 3 groups of 5 persons. The blood clot was forming in patients of group 1 in the formed bone defect. «Dental adhesive paste Solcoseryl» was used for keeping of the blood clot into the wound in patients of the group 2. We introduced the sponge «Gelopack» into the alveolar socket for fixing the blood clot in patients third group. Patients were evaluated at 1, 2, 3, 5, 7, 14 days after surgery on the above criteria.

### Results

80% of patients had complaints of pain in the wound the 1st day in group 1, the pain was stopped for all patients by 5-th day. 60% of patients had complaints of pain in group 2

in the first day of observation and disappeared in the 7 th day. In the third group, 60% of patients had complaints of pain in the alveolar socket on the first and second days, on the third day - 80%, on the fifth - 100%. In 80% of patients the sponge «Gelopak» has been removed from the socket on the 5-7 days, after what the pain relief was noted.

A blood clot in the wound on the 1st day looked appropriately formed in patients of all groups. In group 1 the decay of a blood clot and the development of alveolitis were observed in 20% of cases. The remains of food were found on the surface of the blood clot in group 2 in 20% of cases for 2-3 days. After their removal and antiseptic treatment the healing process of the socket was normalized. The gray powder was formed on the blood clots in the third group on the 2nd day in 20% of patients. On the third day the same had 40% of patients, on the 5th - 80% of patients had suppuration of the tooth extraction socket, for 5-7 days in 80% of patients the sponge «Gelopack» has been removed from the wound that led to the abolishment of inflammatory reaction.

Slight hyperemia of the mucous tunic of the alveolar process in the postoperative wound was observed in all patients of group 1 in the 1st day of observation and remains for 3 days. This index was observed in group 2 in 80% of patients and disappeared 3 days after surgery. In 80% of the patients of group 3 the hyperemia remains for 5-7 days and disappeared after removal of the sponge «Gelopack».

Edema of the mucous tunic of the alveolar process of postoperative wound was observed in 40% of patients in all groups. However, if edema disappeared within 5 days after surgery in the group 1, in the 2nd - on the third day, these indices increased to 80% in the third group and this tendency continued up to 5 days inclusively. After removing the drug from the wound edema was stopped during the day.

All patients had no body temperature rising and increase of submandibular lymph nodes during the examination.

### Conclusion

Application of the drug «Dental adhesive paste Solcoseryl» in order to make additional fixation of the blood clot after surgery of atypical tooth extraction has reduced the pain and hyperemia of the mucous tunic of the alveolar process in the postoperative wound and minimize the development of edema of the soft tissues and mucous tunic of the alveolar process compared with the control group. Application of collagen sponge «Gelopack» in order to fix a blood clot after surgery of atypical tooth extraction is not rational due to the high percentage of complications.

### References

- [1] Bernadskiy Y.I. Basis of maxillofacial surgery and surgical stomatology, Vitebsk: Belmedkniga: 404, 1998. .
- [2] Jańczuk Z. et al. Electro-thermometric study on the healing of free gingival grafts covered by two different dressings, Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl: 3, 235-239, 1990.
- [3] Kryst L. et al. Solcoseryl - dental adhesive paste - in the treatment of postextraction alveolitis, Czas Stomatol: 6, 334-341, 1990.

# A DEVICE FOR TESTING OF THE TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF INTERVERTEBRAL DISC ENDOPROSTHESIS – SBT-03.1 SIMULATOR

ADRIAN MRÓZ<sup>1\*</sup>, TOMASZ WIŚNIEWSKI<sup>1</sup>, MONIKA GIERZYŃSKA-DOLNA<sup>1</sup>, JANUSZ MAGDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> METAL FORMING INSTITUTE,  
14TH JANA PAWLA II STR., 61-139 POZNAN, POLAND  
\*MAILTO: ADRIAN.MROZ@INOP.POZNAN.PL

## Abstract

*As a result of research conducted in the Metal Forming Institute in Poznan, SBT-03 simulator for friction and wear testing of human intervertebral disc endoprostheses was modernized. The structure of the device allows reflecting of the range of mobility and loads present in the natural spine. Moreover, the device allows recording and measurement of such parameters as axial compression force, moment of friction, temperature in the friction loop and number of operation cycles. This enables an evaluation of the intensity of wear processes of different designs of structures of a lumbar spine intervertebral disc endoprostheses depending on the type of materials used and production method.*

**Keywords:** intervertebral disc endoprosthesis of the spine, friction and wear tests, SBT-03.1 simulator, friction coefficient

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 5-6]

## Introduction

Statistics indicate that 80% of adults, regardless of their sex, experienced spinal pains [1]. This is, in particular, a problem of inhabitants of highly developed industrial countries, where considerable limitation of physical activity, prevalence of sitting position and obesity are observed.

Spondyloarthrosis begins frequently in the area of an intervertebral disc – degenerative disc disease [1]. Then it affects other structures of the mobile segment, which is the basic functional unit of the spine. As degenerative disc disease develops, it leads to dehydration of the nucleus pulposus. The process results in a decrease in the height of the intervertebral disc (deteriorating its shock absorption properties), a decrease in the physiological mobility of the mobile segment and disturbance of intervertebral joint loads. A progressing degeneration of the intervertebral disc may lead to a decrease in the surface of the cross-section of the spinal canal (stenosis). This may result in pressure on the dural sac, spinal roots and vascular network causing chronic pains in the spine, including root-type pains or the neurogenic claudication.

A relatively new invasive procedure for the treatment of patients suffering from discogenic back pains is intervertebral disc arthroplasty. This method is an alternative to the patients who have been treated with arthrodesis, i.e. fixation of a damaged segment with adjacent healthy discs [3]. Contrary to arthrodesis, intervertebral disc arthroplasty, in the long run, will not cause disturbance of biomechanics of the spine and, thus, will not lead to a degeneration of the mobile segments adjacent to the operated segment [3].

Presently, the clinical practice uses several types of intervertebral disc endoprostheses. Depending on materials used and the type of structure, intervertebral disc components are exposed to wear as a result of friction between the components. Thus, the basic requirements for friction elements include ensuring of low friction resistance, high resistance to wear and minimum quantity of generated wear products [4]. Getting into perimplant tissues, the particles may cause toxic, allergic and even carcinogenic reactions. The friction and wear tests conducted with special simulators provide an opportunity for preclinical determination of the tribological properties of the friction components of the intervertebral disc endoprosthesis both as regards a short, medium and long period of time.

## Materials and methods

Before the commencement of the design works, the authors explored the scope of mobility of the individual mobile segments of the spine and values of loads to which particular intervertebral discs are subject. The mobility of discs in relation to one another is limited by the influence of the support triad components on a given mobile segment and it may be found in three anatomical planes, i.e. sagittal plane – bending to the front and rear (bend and hyperextension), frontal plane – lateral and traverse bending – rotating movements. From the combination of the above-mentioned movements, a circumduction movement originates. For instance, for the L4-L5 mobile segment the total of flex and reflex movements is 15° and the values of the unilateral lateral bend and unilateral axial twist are 5° and 3° respectively [5].

A healthy intervertebral disc constitutes a hydraulic device, which is subject to permanent influence of compression forces. In the lumbar spine, the value of the compression force exerted on the intervertebral disc in a standing man of average height ranges within approx. 700 to 800 N [6]. The source of the force is muscle tension, body mass above the muscle and external forces.

The main goal of the research conducted on the simulator SBT-01.1 is to determine the impact of friction pair and endoprosthesis construction on the frictional resistance, wear as a function of the number of cycles, changes in surface roughness and study the amount and chemical composition of wear products.

## Results and discussion

A simulator allowing friction and wear testing of the intervertebral disc endoprostheses was modernized for laboratory tests. The simulator is equipped with two servomotors reproducing the basic types of movements and loads that occur in the spine, i.e. bending in the sagittal or frontal plane or axial twisting. In the bottom part of the simulator there is a tightening system, which allows an application of the compression force.

The basic technical parameters realized with the use of the simulator include:

- compression force in the spine axis 0÷3000 N;
- deflection angle at bend: +10°;
- deflection angle at extension: -5°;
- deflection angle at lateral bending: ±7,5°;
- unilateral axial bending angle: ±3°;

Special handles for fastening of the external metal plates allow a stable fixation with the possibility of adjustment of the axial position. FIGURE 1 presents an image of the SBT-01.1 simulator. The simulator is equipped with an automatic measurement system allowing the recording and the measurement of such parameters as axial compression

## Conclusions

The structure of the SBT.03.1 simulator for the friction and wear testing of the intervertebral disc endoprostheses allows a reflection of the scope of mobility and loads occurring in a real spine. This provides an opportunity for preclinical determination of the tribological properties of the friction loop of the intervertebral disc endoprosthesis as regards a short, medium and long period of time. During the testing the endoprosthesis is immersed in a greasing and cooling liquid, which simulates bodily fluids. The presently published papers relating to the issues connected with the wear of the friction elements of the intervertebral disc endoprosthesis are mostly limited to determining of the changes in heights of the individual components. Insufficient attention has been devoted to determining of such parameters as the values of moment of friction, the friction force and the friction coefficient.



FIG. 1. SBT-03.1 simulator.

## Acknowledgments

The Development Project titled "Intervertebral disc endoprosthesis – structure, tests, production technology and preparation for clinical applications" No. 13-004-10 is funded by the National Center of Research and Development with the use of public funds allocated to science.

## References

- [1] Whatley B.R., Wen X., Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration, *Materials Science and Engineering*, 32 (2012) 61–77.
- [2] Van den Eerenbeemt K. D., Ostelo R. W., Van Royen B. J., Peul W. C., Van Tulder, Total disc replacement surgery for symptomatic degenerative lumbar disc disease: a systematic review of the literature, *Euro Spine Journal*, 19, 8, (2010) 1262–1280.
- [3] Nowakowski A., Cabaj M., Kubaszewski Ł., Endoprotezoplastyka krążka międzykręgowego w części lędźwiowej kręgosłupa – doświadczenia wstępne, *Neuroortopedia*, 5, 1, (2003), 58–61.
- [4] Gierzyńska-Dolna M., Lijewski M., Zastosowanie tytanu i jego stopów w implantologii i inżynierii biomedycznej, *Inżynieria Materiałowa* (accepted for print).
- [5] <http://www.synthes.com>.
- [6] Nachemson A. L., An orthopaedic challenge, *Spine*, 1, 1 (1976), 59–71.
- [7] Gierzyńska-Dolna M., *Biotribologia*, Częstochowa, 2002.

## CYTOTOXICITY OF HYDROXYAPATITE COATINGS MODIFIED WITH SILVER NANOPARTICLES

J. SULEJ-CHOJNACKA\*, MIKHAIL IGNATIEV

METAL FORMING INSTITUTE,  
14 JANA PAWŁA II STR., 61-139 POZNAN, POLAND  
\*MAILTO: CHOJNACKA@INOP.POZNAN.PL

## Abstract

*Application of nanosized particles with antibacterial properties is of great interest in the development of new biocompatible products. Due to the excellent antibacterial activity Ag NPs and Ag NPs containing composites are widely used in many bactericidal applications. The objective of the present research is to characterize the cytotoxicity properties of plasma sprayed hydroxyapatite coating (HA) modified by sedimentation of Ag NPs on its' surface. The present research was carried out in the frame of European FP7 NANOMINING Project "Development of New Nanocomposites Using Materials from Mining Industry" (NMP4-CP-2011-263942).*

**Keywords:** plasma spraying, hydroxyapatite, silver nanoparticles, cytotoxicity  
*[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 6-7]*

## Introduction

The percentage of knee, hip and elbow infections is estimated as 0.5-12%; 1-2%; 1-2.5% and 7-9% respectively [1]. Approximately a million people are operated and have implants inserted annually. A small number of the infections may cause serious complications in dozens of patients. An implant surface is susceptible to infections for two main reasons: the formation of a biofilm on the implant surface and a reduced resistance on the implant and tissue interface [2]. The infections are caused mainly by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The bacteria create a biofilm on the implant surface and become extremely resistant to antibiotics. The infection may cause an exhausting pain and long-term disability for the patients.

Presently, hydroxyapatite is widely used in orthopedics, as it shows perfect biocompatibility owing to its similar chemical properties and the bonelike crystallographic structure. The porous structure of hydroxyapatite causes that a strong chemical bonding is created with the natural bone. Moreover, hydroxyapatite is bioactive, which means that it becomes reabsorbed after some time and is replaced by the natural bone. However, low mechanical properties of HA limit its application in implants under high loads [3]. On the other hand, commonly used titanium and its alloys have good biocompatibility, high strength and low density. Apart from that, it shows low resistance to friction wear and release of titanium alloy particles to the surrounding tissues. The combination of HA and its good biotolerance with very good mechanical properties of the titanium seems to be a good solution, which enables a creation of near-perfect biomaterials [4].

Silver-doped HA (Ag+HA) coatings show decreasing toughness with increasing quantities of silver ions. Silver is known for its strong bactericidal properties. Due to the toxicity, compounds based on silver have been widely used



in numerous bactericidal applications. The composite of Ag+HA may improve antibacterial properties of the hydroxyapatite coat and support the regeneration of diseased tissues. Antimicrobial influence of silver or its compounds is proportional to the quantity of the released bioactive silver ions ( $\text{Ag}^+$ ) and their ability to interact with bacterial or fungal cells. Silver shows low toxicity to human body. Chemical properties of silver have not been fully documented and accurate data relating to the relative degrees of silver ionization are not available. The mechanisms depend on numerous factors [5].

This paper aims on preliminary determination of cytotoxicity properties of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings with embedded Ag NPs.

## Materials and methods

Hydroxyapatite coating were plasma sprayed onto flat surfaces of samples made of Ti6Al4V titanium alloy by Projection Plasma System (2PS), a French company, under conditions typical for production of real HA-coated implants. Fabricated samples with HA coating were used in further tests relating to the deposition for sedimentation of silver nanoparticles (Ag NPs) on their surface. The liquid containing Ag NPs with nanoparticle mean size 15 nm (produced by Particular GmbH) was used in sedimentation experiments. The method of Ag NPs sedimentation is relatively simple and it includes an insertion of HA-coated samples in a flask placed on a rotating platform ensuring a maximum rotation speed of 600 rpm. The mixing of the liquid was also realized with the help of magnetic mixer to ensure more uniform distribution of Ag NPs on HA coating surface.

Evaluation of cytotoxicity properties of HA coatings against bone cancer SaOS-2 cells was performed by BioCentrum (Krakow, Poland) both for samples with initial HA coating (Ti6Al4V+HA: HA1\_1, HA1\_2, HA2\_1, HA2\_2) and for samples with HA coating modified with Ag NPs (Ti6Al4V+HA+Ag NPs: 9.11, 9.12, 9.21, 9.22).

## Results and discussions

The cytotoxicity test was performed in accordance with PN-EN ISO 10993-5 and PN-EN ISO 1099-12 standards. The influence of the extracts prepared in a culture medium with fetal bovine serum was determined upon 24- and 48-hour incubation by adding tetrazole salt to the solution. Upon the elapse of the above-mentioned incubation periods, the survival rate of the SaOS-2 cells subject to the influence of the extracts of the tested materials was determined. The results were expressed as a percentage of metabolically active/live cells in relation to the control group, i.e. cells that were not subject to the influence of the tested preparation, but only to the influence of a solvent. The obtained results were analyzed with the use of Dose-response-Inhibition/log(inhibitor) vs. normalized response-Variable slope).

The samples were tested in the following subgroups:

- 1) HA1\_1 and HA1\_2, incubation period – 24 hours,
- 2) 9.11 AND 9.22, incubation period – 24 hours,
- 3) HA2\_1 and HA2\_2, incubation period – 48 hours,
- 4) 9.12 and 9.21, incubation period – 48 hours,

Based on the obtained results (FIG.1), it has been confirmed that HA1\_1, 9.11, 9.22 and HA2\_1, 9.12, 9.21 samples demonstrate cytotoxic effects against the SaOS-2 cells, whereas HA1\_2 and HA2\_2 samples do not show any cytotoxic effects. In the group of HA+Ag NPs samples, all the tested samples showed a decrease in the survival

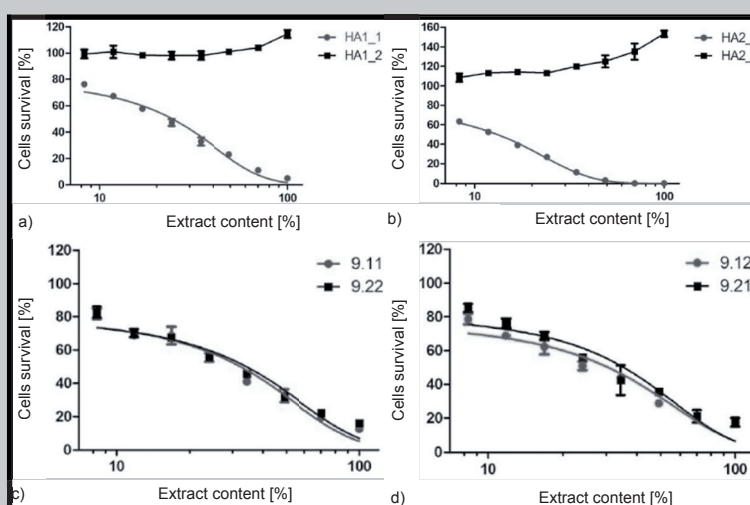


FIG. 1. Influence of biomaterial extract content on bone cancer cells (SAOS-2) survival for ti-alloy samples with HA and HA+AgNP coating: a, c- 24h test, b,d-48h test.

rate of the cells by more than 30 % both after 24-hour and 48-hour incubation.

## Conclusions

Cytotoxic effect against SaOS-2 bone cancer cells was tested both for both for samples with initial HA coating and for samples with HA coating modified with AgNPs. All the tested samples containing Ag NPs showed a decrease in the survival rate of the cells by more than 30 % both after 24-hour and 48-hour incubation.

## Acknowledgments

1. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement No. NMP4-CP-2011-263942.
2. Research work financed from public funds for science in period 2011-2013, granted for realization of international co-financed project.

## References

- [1] Garvin K, Feschuk C. Polylactide-polyglycolide antibiotic implants. Clin Orthop Relat Res 2005;437:105-10.
- [2] L. Zhao, P.K. Chu, Y. Hang, Review, Antibacterial Coatings on Titanium Implants, Journal of Biomedical materials research part B: Applied Biomaterials, vol 913, 2009,1, 470-480.
- [3] Thian E.S., Loh N.H., Khor K.A., Tor S.B.: Biomaterials 23 (2002) 2927, J.K. Liu, X.H. Yang, X.G. Tian, preparation of silver/hydroxyapatite nanocomposite spheres, Powder technology 184, 2008, 21-24.
- [4] K. Niespodziana, K. Jurczyk, L. Kępiński M. Jurczyk, Properties of titanium-hydroxyapatite Nanocomposites, Inżynieria Materiałowa, 3-4/2007, 309-312.
- [5] V. Stanic, D. Janackovic, S. Dimitrijevic, S. B. Tanaskovic, M. Mitric, M. S. Pavlovic, A. Krstic, D. Jovanovic, S. Raicevic, Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering, Applied Surface Science 257 (2011) 4510-4518.



# INVESTIGATION OF INFLUENCE OF INTERNAL ARCHITECTURE ON MECHANICAL PROPERTIES OF 3D PRINTED SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

BARBARA OSTROWSKA, WOJCIECH ŚWIĘSZKOWSKI\*, KRZYSZTOF J. KURZYDŁOWSKI

DIVISION OF MATERIALS DESIGN, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 141 WOŁOSKA STR., 02-507, WARSAW, POLAND.

\*MAILTO: WOJCIECH.SWIESZKOWSKI@INMAT.PW.EDU.PL

## Abstract

*The aim of the study was to investigate the influence of internal architecture of 3D printed scaffolds on their mechanical properties. The polycaprolactone scaffolds with four different geometries produced by rapid prototyping were tested in this study. The 3D samples were manufactured with different internal architecture. The scaffolds were plotted using a 330  $\mu\text{m}$  dispensing needle, layer by layer with lay-down pattern of the fibers:  $0^\circ/45^\circ/90^\circ$ ,  $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ ,  $0^\circ/90^\circ/180^\circ$  and  $0^\circ/60^\circ/120^\circ$  with shifted layers. Scanning electron microscopy analyses and mechanical properties examinations were performed. The mechanical test showed that the highest Young's modulus was obtained for the samples with  $0^\circ/60^\circ/120^\circ$  lay-down pattern, especially after layers shifting. The SEM analyzes didn't show any defects or layers delamination in the scaffolds. All the samples were characterized by appropriate 3D architecture and good layers connections.*

*The obtained results confirmed the hypothesis that scaffolds with  $0^\circ/60^\circ/120^\circ$  lay-down pattern of the fibers and with shifted layers have the highest mechanically properties of the investigated samples and therefore, show high potential to be used in bone tissue engineering application.*

**Keywords:** Scaffolds, internal architecture, polycaprolactone,

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 8-9]

## Introduction

Fabrication of scaffolds for tissue engineering becomes a very popular research topic in present days. There are several fabrication methods currently used for creating 3D porous structures with high porosity and interconnected pores. A rapid prototyping (RP) is one of the most interesting one. It allows for fabrication scaffolds with predesigned external geometry and internal architecture as well as required mechanical properties.

The aim of this study was to create and evaluate a polymeric 3D printed scaffold with different internal architecture which could be used for bone tissue engineering. The influence of internal architecture on mechanical properties of the samples was investigated.

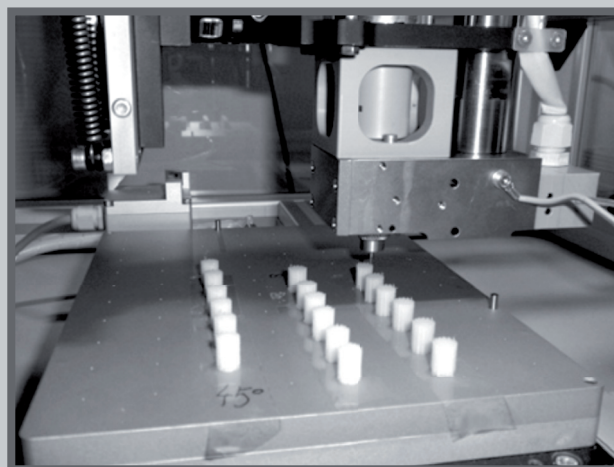


FIG. 1. Samples manufactured using Bioscaffolder® machine (SYSENG, Germany).

## Materials and methods

Cylindrical porous scaffold (height: 4mm, diameter: 6mm) with three-dimensional orthogonal periodic porous architectures, were manufactured by Bioscaffolder® machine (SYSENG, Germany) from  $\epsilon$ -polycaprolactone granulate (Sigma Aldrich PCL, average Mn ca. 80 000), (FIG. 1). The melted polymer was plotted with a 330  $\mu\text{m}$  dispensing needle layer by layer, with lay-down pattern of the fibers:  $0^\circ/45^\circ/90^\circ$ ,  $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ ,  $0^\circ/90^\circ/180^\circ$  and  $0^\circ/60^\circ/120^\circ$  with shifted layers. The temperature of the fabrication process was between  $90^\circ$  and  $100^\circ\text{C}$ . After the samples were fabricated, their 3D structure and internal architecture were investigated by scanning electron microscopy (HITACHI TM1000 and HITACHI SU8000) and microCT (SkyScan 1172). Then, compression tests of the samples were carried out using Zwick material tester (Zwick Z005) at a cross-head speed of 1mm/min up to 50% of compressive strain.

## Results and discussion

The SEM observations of the microfibers scaffolds showed a well-defined internal geometry with regular interconnected pores of dimensions between 300 and 400  $\mu\text{m}$ , as well as uniform distribution (FIG. 2). The extruded filaments had a regular circular geometry with diameter of 300  $\mu\text{m}$ , corresponding to the used nozzle tip (330  $\mu\text{m}$ ) (FIG. 2 a,b,c). Delaminating of the layers wasn't noticed (FIG. 3).

The compression tests were performed to show the influence of internal architecture on mechanical properties of the scaffolds. Mechanical properties analysis showed big differences in elastic modulus between the tested scaffolds (TAB. 1). For the scaffolds without shifted layers Young modulus was the highest for the lay-down pattern of  $60^\circ/120^\circ$  and it was 51.8 MPa The E modulus for the scaffold with

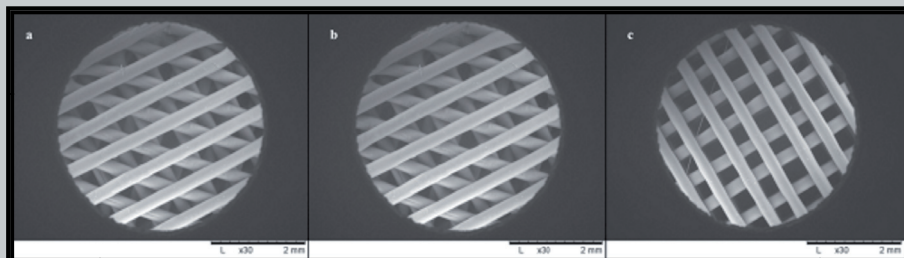


FIG. 2. Scanning Electron Microscopy (SEM) images of samples with internal architecture a)  $00/450/900$ , b)  $60^\circ/120^\circ$ , c)  $90^\circ/180^\circ$ . Top view.

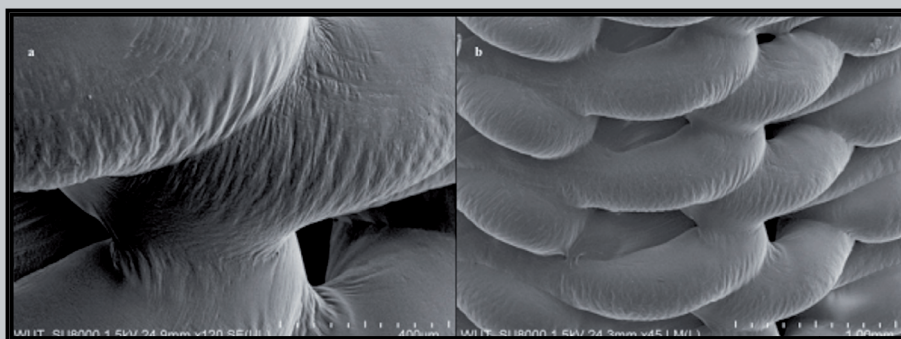


FIG. 3. Scanning Electron Microscopy (SEM) images of scaffold with orientation 600/1200 after shifted layers. Side view.

TABLE 1. Mechanical properties of investigated samples.

Name	E [MPa]	Re0,02 [MPa]	Rm [MPa]	R2
G23_45	33.8	2,7	4.7	0.99999
G23_60	51.8	2.8	5.3	0.99998
G23_60sh1	59.3	3	5.9	0.99998
G23_90	45.2	2.8	4.9	0.99998

the orientation of  $0^\circ/45^\circ/90^\circ$  was only 33.8 MPa. The connections between layers remained consistent under compression in all the tested scaffolds.

## Conclusions

The study demonstrates that PCL scaffolds with shifted layers with internal orientation  $60^\circ/120^\circ$  have the best mechanical properties among tested samples. The shifting of the layers could also improve cell adhesion do the scaffolds by change internal architecture. This type of scaffold can be applied to produce highly functionalized 3D construct for bone tissue engineering applications.

## References

- [1] R. Landers, U. Hübner, R. Schmelzeisen, R. Mülhaupt. "Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering" *Biomaterials* 23 (2002) 4437-4447.
- [2] D.W. Hutmacher, M.A. Woodruff. Design, Fabrication and Characterization of Scaffolds via Solid Free-Form Fabrication Techniques. *Biomaterials Fabrication and Processing Handbook*. CRC Press; p.45-67. 2008.

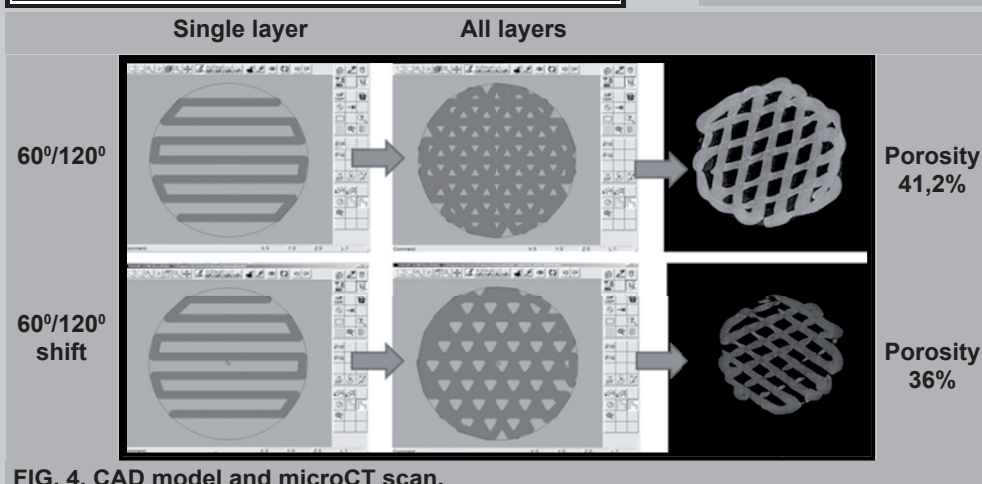


FIG. 4. CAD model and microCT scan.

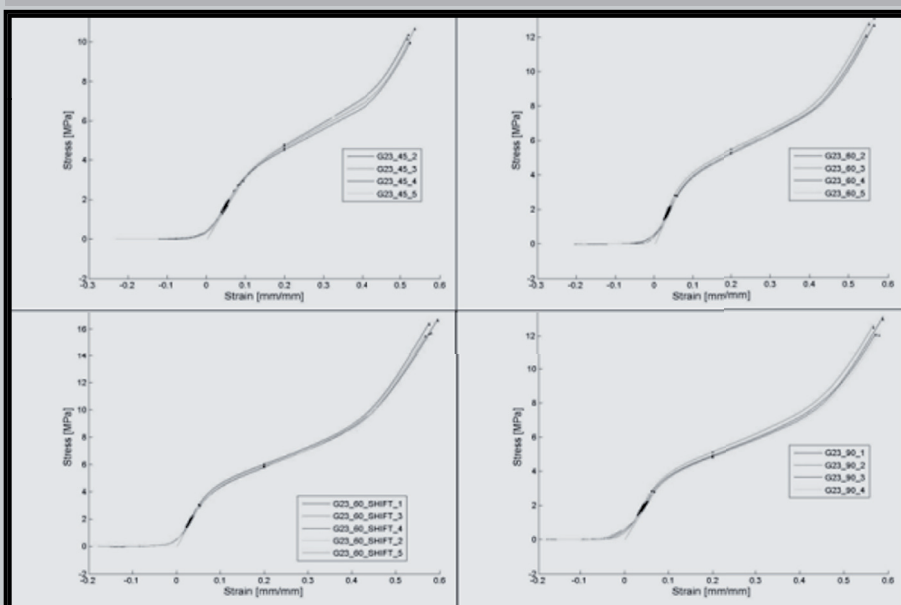


FIG. 5. Results of compression tests for the samples with different fibers orientations: a)  $0^\circ/45^\circ/90^\circ$ , b)  $60^\circ/120^\circ$ , c)  $90^\circ/180^\circ$ , d)  $60^\circ/120^\circ$  with shifted layers.

# ZASTOSOWANIE SKANINGOWEJ MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ DO OBRAZOWANIA ORAZ CHARAKTERYSTYKI NANOWŁÓKIEN POLIMEROWYCH STOSOWANYCH W INŻYNIERII TKANKOWEJ

JOANNA KARBOWNICZEK<sup>1\*</sup>, MATEJ BUZGO<sup>2</sup>, ALEKSANDRA CZYRSKA-FILEMONOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>WYDZIAŁ INŻYNIERII METALI I INFORMATYKI PRZEMYSŁOWEJ, AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>2</sup>INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MEDICINE AS CR, VÍDEŇSKÁ 1083, 142-20 PRAGA, REPUBLIKA CZESKA

\*MAILTO: JKARBOW@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

*Zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) pozwoliło na zobrazowanie struktury nanowłókien polimerowych otrzymanych techniką elektroprzędzenia. Na podstawie obrazów SEM przeprowadzono analizę morfologii i dystrybucji włókien, jak również wykonano pomiary średnicy włókien oraz wielkości porów. Te parametry są niezbędne do określania zależności między strukturą rusztowań komórkowych, a wzrostem komórek i tworzeniem tkanek.*

**Słowa kluczowe:** SEM, elektroprzędzenie, nanowłókna polimerowe, rusztowania tkankowe  
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 10-12]

## Wprowadzenie

Jednym z aspektów inżynierii tkankowej jest zaprojektowanie rusztowań komórkowych o odpowiedniej strukturze przestrzennej oraz parametrach mechanicznych i biologicznych zbliżonych do naturalnej substancji międzykomórkowej (ang. extracellular matrix – ECM). W zależności od odtwarzanej tkanki parametry rusztowań komórkowych nieznacznie się różnią, jednak można określić podstawowe, wspólne cechy takich rusztowań: biogodność, biodegradowalność, porowata struktura charakteryzująca się wysokim stosunku powierzchni do objętości „naśladująca” naturalną substancję międzykomórkową [1]. Nanowłókna polimerowe otrzymywane za pomocą elektroprzędzenia spełniają wymienione warunki.

Elektroprzędzenie jest szybką i prostą techniką pozwalającą na otrzymanie nanowłókien polimerowych o odpowiednich parametrach do zastosowań w inżynierii tkankowej. Urządzenie do elektroprzędzenia składa się ze zbiornika na rozpuszczony polimer zakończonego dyszą, dwóch elektrod, stałoprądowego źródła wysokiego napięcia i kolektora w formie uziemionej płyty, na której osadzone jest przędzone włókno. Parametry procesu takie jak: rodzaj polimeru, stężenie roztworu, zastosowanie czynników sieciujących, jak również napięcie i odległość między dyszą, a kolektorem mają znaczący wpływ na właściwości otrzymanych włókien (średnicę i rozmieszczenie włókien oraz kształt i geometrię porów) [2]. Elektroprzędzenie jest prostą, elastyczną i tanią techniką, co czyni ją odpowiednią do szerokiego zakresu zastosowań, takich jak filtracja, tekstylia, energia, akustyka i inżynieria tkankowa [3].

# SCANNING ELECTRON MICROSCOPY APPLIED FOR VISUALIZATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMER NANOFIBERS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

JOANNA KARBOWNICZEK<sup>1\*</sup>, MATEJ BUZGO<sup>2</sup>, ALEKSANDRA CZYRSKA-FILEMONOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FACULTY OF METAL ENGINEERING AND INDUSTRIAL COMPUTER SCIENCE, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 30 MICKIEWICZA AVE.30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup>INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MEDICINE AS CR, 1083 VÍDEŇSKÁ STR., 142-20 PRAGUE, CZECH REPUBLIC

\*MAILTO: JKARBOW@AGH.EDU.PL

## Abstract

*Scanning electron microscopy (SEM) was applied for visualization of the structure of polymer nanofibres produced by electrospinning method. The SEM images were used for analyses of the fibers' morphology and distribution. The fibers diameter and the size of pores were measured based on the SEM images. These parameters will be useful for determination of the correlation between the scaffold structure and cells growth.*

**Keywords:** SEM, electrospinning, polymer nanofibers, scaffolds  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 10-12]

## Introduction

One aspect of tissue engineering is the design of the scaffolds with specific spatial structure and mechanical and biological properties similar to native extracellular matrix (ECM). Although the desired characteristics of a scaffold vary slightly with the tissue trying to be reconstructed, there are general properties that are desirable: biocompatibility, biodegradability, porous structure with a high surface-volume ratio that mimics native ECM [1]. Polymer nanofibers obtained by electrospinning fulfill these conditions.

Electrospinning is a fast and simple method to obtain polymer nanofibers with proper characteristics for tissue engineering applications. It is an electrostatic processing method allowing to obtain fibers with nanoscale properties. Device for electrospinning consists of a tank for polymer solution terminated with the nozzle, the two electrodes, the high voltage source and a grounded collector plate where the spun fibers are collected. Process parameters like: type of the polymer, solution concentration, cross-linking factors use, as well as voltage and distance between the nozzle and collector have the influence on the properties of obtained fibers (diameter and distribution of the fibers, size and geometry of the pores) [2]. Electrospinning is a simple, flexible and cost efficient technique, what makes it suitable for a broad range of applications, such as filtration, textiles, energy, acoustics and tissue engineering [3].

## Materials and methods

Polymer nanofibers were prepared by electrospinning technique in the Institute of Experimental Medicine AS CR,



## Material i metody

Nanowłókna polimerowe wykonano techniką elektroprzędzenia w Institute of Experimental Medicine AS CR, Laboratory of Tissue Engineering w Pradze. Przygotowane zostały trzy próbki w tym: dwie z PVA (polialkohol winylowy) z czynnikiem sieciującym (glioksal) oraz jedna z PCL (polikaprolakton).

Analizę mikrostruktury obu typów polimerów przeprowadzono za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej. Próbkę do badań SEM została nasycona warstwą materiału przewodzącego (srebro). Obrazy SEM wykonano za pomocą FEG NEON 40EsB CrossBeam (Zeiss) z systemem mikroanalizy EDX Quantax 200 (Bruker). Ilościowa analiza obrazów została przeprowadzona z wykorzystaniem komercyjnego oprogramowania "AnalySIS 3.2" [4].

## Wyniki i dyskusja

RYS.1 przedstawia strukturę włókien otrzymanych techniką elektroprzędzenia, wykonanych z: PVA (RYS.A,B) oraz PCL (RYS.C). Na zamieszczonych obrazach SEM widoczne są różnice w ich strukturze. Zastosowanie czynnika sieciującego powoduje powstawanie rozgałęzionych włókien (RYS.1 A i B), natomiast podczas elektroprzędzenia PCL bez czynnika sieciującego otrzymano pojedyncze włókna o losowym rozmieszczeniu. Włókna otrzymane z dwóch typów polimerów wykazują różną wielkość. Zmierzona średnica włókien otrzymanych z PCL wynosiła około 20  $\mu\text{m}$ , podczas gdy średnica nanowłókien otrzymanych z PVA była znacznie mniejsza i wynosiła około 120 nm.

Dalsze analizy morfologii włókien, porowatości rusztowań komórkowych, jak również przygotowanie nowych próbek są w toku.

Laboratory of Tissue Engineering in Prague. Two samples of PVA (polyvinyl alcohol) with cross-linking factor (glyoxal) and

one sample of PCL (poly-epsilon-caprolactone) without cross-linking factor were prepared.

Microstructural analyses of both types of polymer were performed by means of scanning electron microscopy. Samples for SEM investigation were covered with silver nanoparticles for electrical conductivity. The SEM images were recorded using FEG NEON 40EsB CrossBeam of Zeiss with EDX Quantax 200 of Bruker. Quantitative image analysis was performed using commercial software "AnalySIS 3.2" [4].

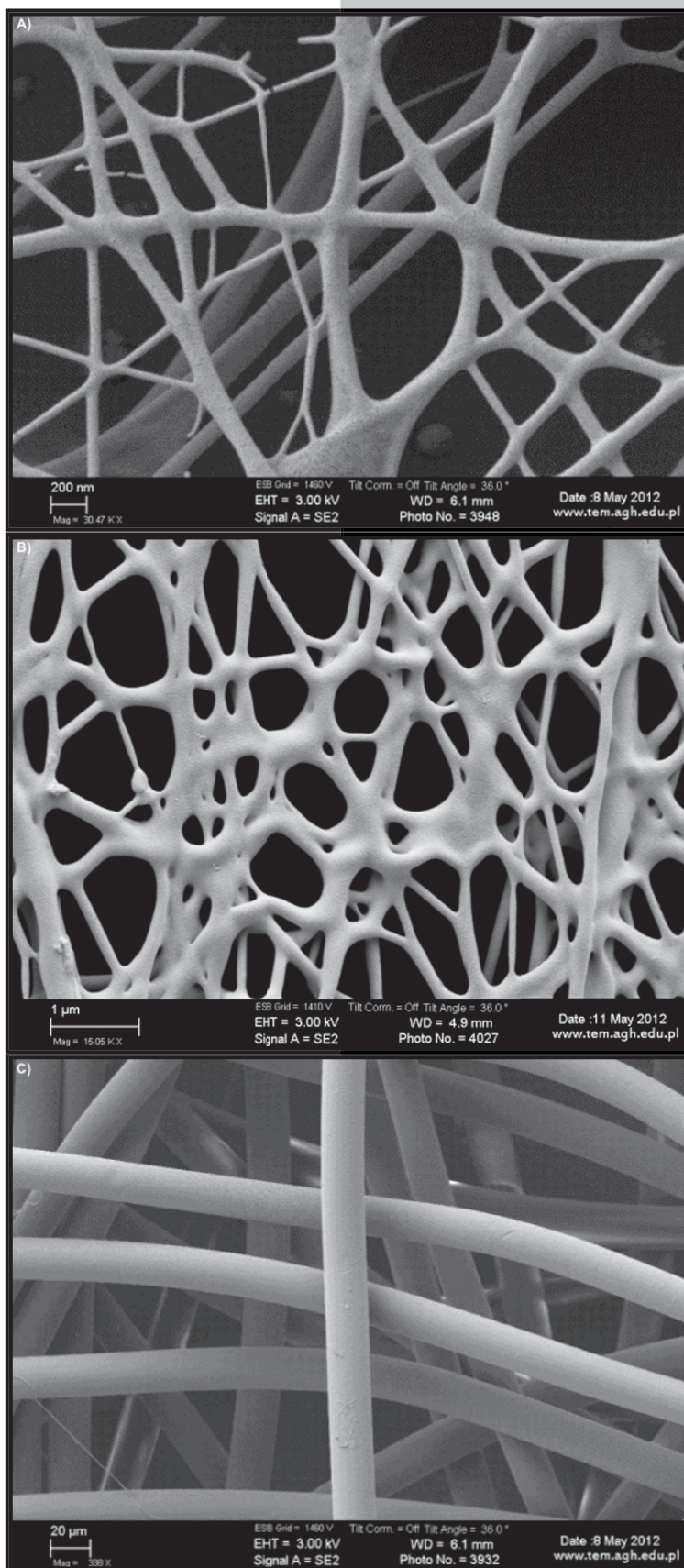
## Results and discussion

FIG.1 shows the structure of electrospun fibers, PVA (FIG. A,B) and PCL (FIG.C) as seen by SEM. Presented SEM images show the differences in the structure of electrospun fibers. Application of cross-linking factor resulted in obtaining branched fibers (FIGS. 1. A and B), while by electrospinning of the PCL polymer without cross-linking factor, single fibers with random distribution were obtained. Two types of polymers exhibited different sizes of produced fibers. The PCL fibers diameter was measured for approx. 20  $\mu\text{m}$  while the PVA nanofibers were much smaller and their diameter was measured for approx. 120 nm.

Further analyses of fiber morphology and scaffold porosity as well as preparation of new polymer samples are in progress.

## Conclusions

Two types of polymer samples, the PVA (poly-



RYS. 1. Obrazy SEM nanowłókien polimerowych, a) i b) włókna otrzymane z pva z czynnikiem sieciującym (glioksal), c) włókna otrzymane z pcl bez czynnika sieciującego.

FIG. 1. SEM images of electrospun polymer nanofibers A) and B) PVA nanofibers with cross-linking factor (glyoxal) C) PCL fibers without cross-linking factor.



Dwa rodzaje polimerowych próbek, PVA (polialkohol winylowy) z czynnikiem sieciującym (glioksal) oraz PCL (polikaprolakton) bez czynnika sieciującego, zostały z powodzeniem otrzymane techniką elektroprzędzenia.

Analiza ich struktury została wykonana za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej. Obrazy SEM umożliwiają nie tylko zobrazowanie morfologii i struktury nanowłókien, ale również pozwalają na wykonanie pomiarów średnicy włókien oraz rozmiaru porów w rusztowaniach komórkowych. Dla dwóch rodzajów polimerów rozmiary otrzymanych włókien były różne w zależności od zastosowanego polimeru, średnica nanowłókien wykonanych z PVA była znacznie mniejsza, niż włókien otrzymanych z PCL.

Przeprowadzenie badań in vitro umożliwi otrzymanie niezbędnych danych do wyznaczenia bezpośredniej zależności między parametrami struktury rusztowań komórkowych, a wzrostem i proliferacją komórek na tych rusztowaniach. Wyniki kompleksowej charakterystyki nanowłókien polimerowych przyczynią się do ulepszenia materiałów stosowanych jako rusztowania w inżynierii tkankowej.

## Podziękowania

*Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu COST MP1005 "From nano to macro biomaterials (design, processing, characterization, modeling) and applications to stem cells regenerative orthopedic and dental medicine" (NAMABIO). Jeden z autorów - Joanna Karbowniczek chciałaby złożyć podziękowania dla Prof. Evžen Amler'a i jego zespołu za gościnność i cenne dyskusje podczas jej pobytu na STSM w Pradze. Specjalne podziękowania dla Mgr Adama Gruszczyńskiego (AGH) za pomoc w analizie SEM.*

vinyl alcohol) with cross-linking factor (glyoxal) and the PCL (poly-epsilon-caprolactone) without cross-linking factor were successfully prepared by electrospinning method.

Their structure was investigated by means of scanning electron microscopy methods. The SEM images not only visualize the morphology and structure of polymer nanofibers, but also allow for measurement of the diameter of fibers as well as pores size in the scaffolds structure. Two types of polymers exhibited different sizes of produced fibers; the PVA nanofibers were much smaller in the diameter than the PCL ones.

Future in vitro studies will provide the data for determination a direct correlation between the parameters of the structure of scaffolds and cells growth and proliferation on them. Results of complex characterization of polymer nanofibers will contribute to improvement of the materials used for scaffolds in tissue engineering.

## Acknowledgments

*The study was performed within the COST MP1005 Action on "From nano to macro biomaterials (design, processing, characterization, modeling) and applications to stem cells regenerative orthopedic and dental medicine" (NAMABIO). One of the authors (Joanna Karbowniczek) would like to thank Prof. Evžen Amler and his team for hospitality and valuable discussions during her STSM stay in Prague. Special thanks are also due to Adam Gruszczyński, MSc. (AGH-UST) for the help to SEM investigation.*

## Piśmiennictwo

- [1]. Pham Q. P., Sharma U., Mikos A. G., Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Engineering*, 12 (2006), 1197-1211.
- [2]. Frenot A., Chronakis I. S., Polymer nanofibers assembled by electrospinning, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8 (2003), 64-75.

## References

- [3]. Kubinova S., Sykova E., Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minimally Invasive Therapy*, 19 (2010), 144-156.
- [4]. Image analysis software of Soft Imaging System GmbH; <http://www.softimaging.net>

# KOMPOZYTOWA POWŁOKA PEEK / BIOSZKŁO® NA STOPIE TYTANU Ti-6Al-7Nb DO ZASTOSOWAŃ W MEDYCYNIE

TOMASZ MOSKALEWICZ<sup>1\*</sup>, SIGRID SEUSS<sup>2</sup>, ALDO R. BOCCACCINI<sup>2</sup>, MARCIN KOT<sup>3</sup>, ALEKSANDRA CZYRSKA-FILEMONOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII METALI I INFORMATYKI PRZEMYSŁOWEJ, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>2</sup> INSTITUTE OF BIOMATERIALS, UNIVERSITY OF ERLANGEN-NÜRNBERG, CAUERSTR. 6, 91058 ERLANGEN, NIEMCY

<sup>3</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MECHANICZNEJ I ROBOTYKI, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

\*MAILTO: TMOSKALE@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

*Kompozytowa powłokę polieteroeteroketon (PEEK)/Bioszko osadzono metodą elektroforezy na stopie tytanu Ti-6Al-7Nb. W celu poprawy przyczepności powłoki do podłoża próbkę poddano wyżarzaniu po obróbce powierzchniowej. Mikrostrukturę powłoki charakteryzowano za pomocą mikroskopii świetlnej oraz skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Powłoka była jednorodna i porowata, nie stwierdzono obecności pęknięć. Powłoka zbudowana była z cząstek bioszka rozmieszczonych w polimerowej osnowie. Wyniki liniowej analizy składu chemicznego wykonanej metodą STEM-EDS wskazują na dyfuzję Na ze szkła do polimeru podczas wygrzewania próbki*

**Słowa kluczowe:** stop tytanu, powłoka kompozytowa, PEEK, bioszko

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 13-15]

## Wprowadzenie

Ze względu na dużą odporność na korozję i korzystne właściwości mechaniczne stopy tytanu są szeroko stosowane w medycynie na trzpienie endoprotez stawowych [1,2]. Obecnie najczęściej stosowane są dwufazowe ( $\alpha+\beta$ ) stopy tytanu, Ti-6Al-4V oraz Ti-6Al-7Nb. Stop Ti-6Al-7Nb charakteryzuje się lepszą biokompatybilnością od stopu Ti-6Al-4V, ponieważ toksyczny wanad został w tym stopie zastąpiony niobem [3]. W niektórych zastosowaniach np. trzpienie, czy panewki endoprotez wymagane jest trwałe połączenie implantu z tkanką kostną. Dlatego w obecnej pracy, w celu poprawy połączenia implant-tkanka kostna, na stopie tytanu wytworzono porowatą powłokę kompozytową PEEK/Bioszko poprzez osadzanie elektroforetyczne (EPD). PEEK charakteryzuje się dużą wytrzymałością zmęczeniową, odpornością na ścieranie i dużą odpornością chemiczną, a ponadto zaliczany jest do materiałów nie toksycznych [4]. Powłoki PEEK/Bioszko były badane wcześniej, jednak osadzane były na stopie NiTi [5], a nie na konwencjonalnym stopie tytanu. W celu zwiększenia bioaktywności do osnowy polimeru wprowadzono cząstki bioszka, które cechują się zdolnością do osadzania się w płynach fizjologicznych fosforanów wapnia ułatwiających wzrost z tkanką kostną [6]. Celem obecnej pracy było wytworzenie kompozytowej powłoki PEEK/Bioszko na stopie Ti-6Al-7Nb metodą elektroforezy oraz charakterystyka mikrostruktury powłoki.

# COMPOSITE POLYETHERETHERKETONE / BIOGLASS® COATING ON Ti-6Al-7Nb ALLOY FOR MEDICAL APPLICATION

TOMASZ MOSKALEWICZ<sup>1\*</sup>, SIGRID SEUSS<sup>2</sup>, ALDO R. BOCCACCINI<sup>2</sup>, MARCIN KOT<sup>3</sup>, ALEKSANDRA CZYRSKA-FILEMONOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF METALS ENGINEERING AND INDUSTRIAL COMPUTER SCIENCE, 30 A. MICKIEWICZA AVE., 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF BIOMATERIALS, UNIVERSITY OF ERLANGEN-NÜRNBERG, CAUERSTR. 6, 91058 ERLANGEN, GERMANY

<sup>3</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING AND ROBOTICS, 30 A. MICKIEWICZA AVE., 30-059 KRAKOW, POLAND

\*MAILTO: TMOSKALE@AGH.EDU.PL

## Abstract

*A composite polyetheretherketone (PEEK)/Bioglass® coating was electrophoretically deposited on the Ti-6Al-7Nb substrate. Post heat treatment was performed to improve the adhesion of the coating to the substrate. The microstructure of the coating and a substrate was examined by light microscopy, scanning- and transmission electron microscopy methods. The coating is uniformly porous, without any cracks or presence of large voids. The coating is composed of Bioglass® particles embedded in a PEEK matrix. STEM-EDS line analysis revealed diffusion of Na from the glass to the PEEK.*

**Keywords:** titanium alloy, composite coating, PEEK, bioglass

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 13-15]

## Introduction

Titanium alloys are widely used in medicine for load bearing components of prostheses due to their good corrosion resistance and advantageous mechanical properties [1,2]. The Ti-6Al-7Nb alloy belongs to two phase ( $\alpha+\beta$ ) titanium alloys and exhibits better biocompatibility than more widely used Ti-6Al-4V alloy. The toxic vanadium in this alloy is replaced by niobium, which is claimed to be non-toxic in interaction with human tissue [3]. In some medical applications, e.g. steam or acetabulum of joint prostheses, a strong bonding between the implant and the surrounding human tissue is required. Therefore, in this work, in order to improve bonding between the titanium alloy and surrounding tissue porous composite PEEK/Bioglass® coatings were deposited on titanium alloy by electrophoretic deposition (EPD). The PEEK is a bioinert, non-toxic and stable polymer [4]. The surface activation of PEEK has been proposed to enhance its bioactivity for wider use in medicine. The EPD of PEEK/Bioglass® coatings has been investigated previously on Nitinol® wires [5], but not on the Ti-6Al-7Nb alloy. As a bioactive agent, commercially available bioactive glass particles (Bioglass®) were used. Bioglass® is a well-known silicate bioactive material which was developed more than 40 years ago and is being considered for numerous biomedical applications for its ability to bond to bone tissue in vivo [6]. The aim of this work was to investigate the deposition

Badania przeprowadzono na dwufazowym ( $\alpha+\beta$ ) stopie Ti-6Al-7Nb. Stop został dostarczony przez firmę BÖHLER Edelstahl GmbH, Niemcy, w stanie po walcowaniu na gorąco i wyżarzaniu (750°C/2h).

Do osadzania powłok metodą elektroforetyczną stosowano zawiesinę proszku PEEK (o nazwie handlowej Victrex® Vicote® 704) o średnicy 10  $\mu\text{m}$  z dodatkiem cząstek bioszklą w etanolu. Stosowano Bioszkło 45S5 o następującym składzie chemicznym (w % masowych): 45 SiO<sub>2</sub>, 24,5 Na<sub>2</sub>O, 24,5 CaO i 6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Stosunek udziału objętościowego polimeru do bioszklą wynosił 0,3. Osadzanie powłoki wykonano przy stałym napięciu z zakresu 50-65 V, czas osadzania wynosił 2 minuty, odległość między elektrodami wynosiła 5 mm. Po osadzeniu powłoki próbka została wyżarzona w temperaturze 355°C przez 1 godzinę.

Badania mikrostruktury powłoki przeprowadzono za pomocą mikroskopii świetlnej, skaningowej- oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (SEM, TEM). Lamelę z przekroju poprzecznego próbki przygotowano za pomocą mikroskopu SEM z działem jonowym (ang. Focused Ion Beam, FIB). Identyfikację faz przeprowadzono metodą selektywnej dyfrakcji elektronów (SAED) oraz metodą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (XRD). Do analizy składu chemicznego wykorzystano spektroskopię promieniowania rentgenowskiego z dyspersją energii (SEM-EDS, TEM-EDS i STEM-EDS).

Przyczepność powłoki do podłoża badano za pomocą próby zarysowania przy użyciu diamentowego wglębniaka Rockwella C o promieniu zaokrąglenia wierzchołka 200  $\mu\text{m}$ . Stosowano obciążenie zmieniające się liniowo, w zakresie od 0,03 do 10 N, na całej długości odcinka pomiarowego, który wynosił 3 mm. Prędkość przesuwu wglębniaka wynosiła 3 mm/min.

## Wyniki i dyskusja

Mikrostruktura stopu Ti-6Al-7Nb w stanie dostawy zbudowana była z ziaren fazy  $\alpha$  (struktura krystaliczna heksagonalna zwarta; HZ) i ziaren fazy  $\beta$  (struktura krystaliczna regularna przestrzennie centrowana; RPC). Średnicę ziaren wyznaczona na obrazach mikrostruktury z SEM i TEM wynosiła 0,1-1,5  $\mu\text{m}$  dla fazy  $\alpha$  i 0,1-0,3  $\mu\text{m}$  dla fazy  $\beta$ . Mikrostruktura stopu została szczegółowo opisana w pracy [7].

Stwierdzono, że powłoka PEEK/Bioszkło po wyżarzaniu była jednorodna. Nie obserwowano pęknięć. Badania mikrostruktury powłoki za pomocą SEM wykazały, że powłoka charakteryzuje się dużą porowatością (RYS.1a). Średnica porów wynosiła do 30  $\mu\text{m}$ . Grubość powłoki oszacowana na obrazach mikrostruktury SEM wynosiła 40-45  $\mu\text{m}$  (RYS.1b).

Badania składu chemicznego powłoki za pomocą spektroskopii promieniowania rentgenowskiego z dyspersją energii (SEM-EDS) potwierdziły obecność cząstek bioszklą w polimerowej osnowie. Średnica cząstek bioszklą nie przekraczała 20  $\mu\text{m}$ . Charakterystyka mikrostruktury za pomocą TEM wykazała, że obie fazy,

by EPD of PEEK/Bioglass® coatings on Ti-6Al-7Nb alloy and to perform a complete microstructure characterisation of the coatings which are intended for medical implants.

## Materials and methods

The Ti-6Al-7Nb is a two phase ( $\alpha+\beta$ ) titanium alloy. The alloy was delivered by BÖHLER Edelstahl GmbH, Germany, as hot rolled and annealed at 750 °C/2 h alloy.

Suspension of PEEK (Victrex® Vicote® 704) powder (size of 10  $\mu\text{m}$ ) in ethanol with addition of Bioglass® 45S5 particles (chemical composition: 45 SiO<sub>2</sub>, 24.5 Na<sub>2</sub>O, 24.5 CaO, 6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, wt %) was used for coatings deposition by the EPD. The PEEK/Bioglass® weight ratio was 0.3. The EPD was carried out under constant voltage conditions in the range of 50-65 V. Deposition time was 2 min, the distance between electrodes in the EPD cell was 5 mm. Post heat treatment at temperature of 355 °C during 1 hour was applied.

Microstructure of the coating was characterised by light microscopy (LM) as well as scanning- and transmission electron microscopy (SEM, TEM). The cross-section lamella for TEM investigation was prepared by Focused Ion Beam (FIB). Phase identification was performed by means of selected area electron diffraction (SAED) and by X-ray diffractometry (XRD). The phase identification was supplemented by energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS, TEM-EDS and STEM-EDS).

The adhesion of the coating to the underlying titanium alloy was investigated by means of scratch test method. The scratch tests were performed using Rockwell C indenter with the diamond tip radius of 200  $\mu\text{m}$ , speed (dx/dt) of 3 mm/min, load range of 0,03-10 N and scratch length of 3 mm.

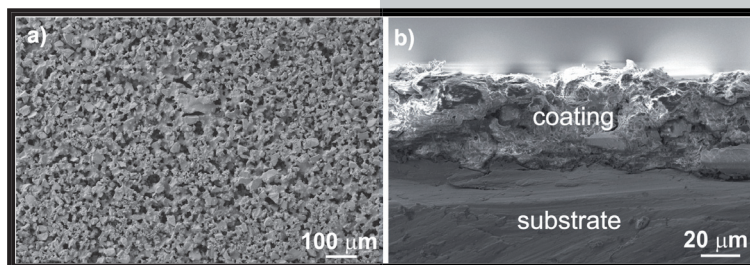
## Results and discussions

Microstructure of the Ti-6Al-7Nb alloy was composed of  $\alpha$  grains (hexagonal close-packed; hcp) and  $\beta$  grains (body-centred cubic; bcc). The size of  $\alpha$  and  $\beta$  grains was measured on SEM and TEM images to be in the range of 0.1-1.5  $\mu\text{m}$  and 0.1-0.3  $\mu\text{m}$ , respectively. The microstructure of this alloy was described in detail in Ref. [7].

It was found that sintering of as-deposited coating led to uniform, dense PEEK/Bioglass® coating without any cracks or large voids. However, SEM investigation of plan-view and cross-sections revealed that the coating was porous (FIG. 1a) and had a uniform thickness of about 40-45  $\mu\text{m}$  (FIG. 1b). The pores diameter was up to 30  $\mu\text{m}$ .

Energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS) analyses confirmed the presence of Bioglass® particles embedded in the PEEK matrix. The diameter of Bioglass® particles was evaluated as up to 20  $\mu\text{m}$ . TEM investigation

revealed that both phases, glass and polymer were amorphous in an investigated area. Electron diffraction patterns taken from the polymer and Bioglass® grains were composed of diffuse („hallo”) diffraction rings. The XRD analyses were performed for PEEK powder and Bioglass® particles used for coating deposition as well as for the coated alloy. The XRD patterns confirmed an amorphous structure



**RYS. 1.** Mikrostruktura kompozytowej powłoki PEEK/Bioszkło na stopie Ti-6Al-7Nb. Obrazy SEM przekroju wzdłużnego (a) i przekroju poprzecznego (b) próbki.

**FIG. 1.** Microstructure of the PEEK/Bioglass® coating on Ti-6Al-7Nb titanium alloy. SEM plan-view (a) and cross-section (b) specimens.



polimer i szkło były amorficzne. Dyfraktogramy elektronowe wykonane z ziaren polimeru i szkła wykazywały charakterystyczne dla materiałów amorficznych rozmycie pierścieni dyfrakcyjnych. Rentgenowską analizę fazową wykonano dla proszku PEEK i cząstek bioszklę stosowanych do osadzania powłoki oraz dla stopu z powłoką. Spektrum XRD potwierdziło amorficzną strukturę bioszklę. PEEK wykazywał strukturę semikrystaliczną (RYS.2). Obie fazy występowały w spektrum XRD wykonanym z próbki stopu tytanu z powłoką. Wyniki liniowej analizy składu chemicznego STEM-EDS wskazują na dyfuzję Na ze szkła do polimeru podczas wyżarzania próbki w temperaturze 355°C.

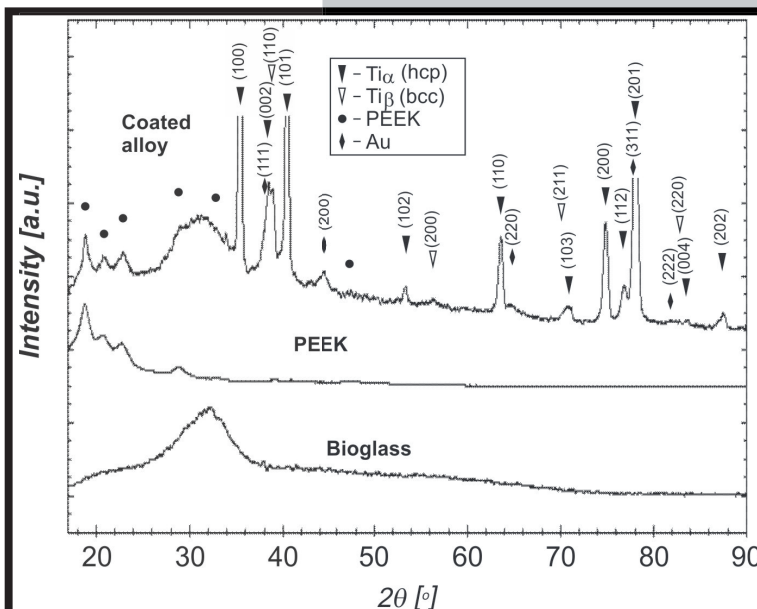
Próba zarysowania wykazała wystarczającą do zastosowań konstrukcyjnych przyczepność powłoki do stopu tytanu. Podczas próby nie obserwowano pęknięć kohezyjnych w powłoce. Pierwsze pęknięcia adhezyjne i odsłanianie podłoża występowały przy obciążeniu 4,5 N.

## Podsumowanie

Powłoka kompozytowa PEEK/bioszkło została osadzona elektroforetycznie na stopie tytanu Ti-6Al-7Nb. Grubość powłoki wynosiła 40-45  $\mu\text{m}$ . Powłoka była jednorodna i charakteryzowała się dużą porowatością. Nie stwierdzono występowania pęknięć. Powłoka była zbudowana z cząstek bioszklę (o średnicy do 20  $\mu\text{m}$ ) rozmieszczonych równomiernie w osnowie PEEK. Wykazano dyfuzję Na ze szkła do polimeru podczas wyżarzania próbki w temperaturze 355°C. Powłoka ma wystarczającą przyczepność do badanego stopu tytanu dla jego zastosowania jako materiał konstrukcyjny.

## Podziękowania

Badania zostały wykonane w ramach realizacji projektu COST MP1005 pt. „From nano to macro biomaterials (design, processing, characterization, modeling) and applications to stem cells regenerative orthopedic and dental medicine” (NAMABIO).



RYS. 2. Spektrum XRD dla proszku PEEK, bioszklę i powłoki PEEK/Bioszkło na stopie Ti-6Al-7Nb.

FIG. 2. XRD pattern of the PEEK powder, Bioglass® particles and PEEK/Bioglass® coating on Ti-6Al-7Nb titanium alloy.

of Bioglass® particles. The PEEK powder was semi-crystalline (FIG.2). The results of the STEM-EDS line analysis indicated diffusion of Na from the glass particles to the PEEK, which has occurred during sintering at 355°C.

It was found that the coating has sufficient (for non-tribological applications) adhesion to the titanium alloy substrate. No cohesive cracks were observed during scratch test. First adhesive cracks were observed after scratching with a 4.5 N load.

## Summary

A composite PEEK/Bioglass® coating was successfully deposited on Ti-6Al-7Nb alloy by the EPD. The coating (40-45  $\mu\text{m}$  thick) was uniform and porous, without any cracks or large voids. The coating was composed of Bioglass® particles (up to 20  $\mu\text{m}$  in diameter) embedded in a PEEK matrix. STEM-EDS line analysis revealed diffusion of Na from the glass to the PEEK after sintering. It was found that the coating exhibit sufficient adhesion to the substrate for non-tribological application.

## Acknowledgments

This work was supported by the EU COST MP1005 project „From nano to macro biomaterials (design, processing, characterization, modeling) and applications to stem cells regenerative orthopedic and dental medicine” (NAMABIO).

## Piśmiennictwo

- [1] D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, Titanium in medicine. Berlin: Springer-Verlag; 2001.
- [2] X. Liua, P.K. Chub, Ch. Dinga, Mater. Sci. Eng. R 47 (2004) 49-121.
- [3] M.F. López, A. Gutiérrez, J.A. Jiménez, Surf. Sci. 482-485 (2001) 300-305.
- [4] L. Petrovic, D. Pohle, H. Munstedt, T. Rechtenwald, K.A. Schlegel, S. Rupprecht, J. Biomed. Sci. 13 (2006) 41-46.

## References

- [5] A.R. Boccaccini, C. Peters, J.A. Roether, D. Eifler, S.K. Misra and E.J. Minay, J. Mater. Sci. 41 (2006) 8152-8159.
- [6] L.L. Hench, J. Am. Ceram. Soc. 81 (1998) 1705-1728.
- [7] T. Moskalewicz, A. Czyrska-Filemonowicz, A.R. Boccaccini, Surf. Coat. Technol. 201 (2007) 7467-7471.

# POWŁOKA HYDROKSYAPATYTOWA NA NANORURKOWEJ WARSTWIE TLENKOWEJ NA STOPIE TYTANU

SYLWIA SOBIESZCZYK

POLITECHNIKA GDAŃSKA

WYDZIAŁ MECHANICZNY

UL. NARUTOWICZA 11/12, 80-233 GDAŃSK, POLSKA

MAILTO: SSOBIESZ@PG.GDA.PL

## Streszczenie

*Przedstawiono sposób nakładanie powłok hydroksyapatytowych na porowaty stop tytanu Ti13Nb13Zr za pomocą osadzania biomimetycznego poprzez zanurzenie materiału w przesyconym symulowanym płynie fizjologicznym. Powłoka hydroksyapatytowa została osadzona na nanorurkowej warstwie tlenkowej, otrzymaną w wyniku utleniania elektrochemicznego w roztworze zawierającym jony fluorowe.*

*[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 16-18]*

## Wprowadzenie

Porowate implanty tytanowe stanowią rusztowanie przenoszące obciążenia dla nowotworzonej tkanki kostnej. Wadą biomateriałów tytanowych jest ich słaba osteointegracja, czyli bezpośrednie połączenie zarówno strukturalne, jak i czynnościowe z otaczającą tkanką kostną, przez co wymagana jest dodatkowa modyfikacja powierzchni. Spośród wielu metod modyfikacji powierzchni stopów Ti na implanty, proponuje się obecnie utlenianie elektrochemiczne prowadzące do warstwy nanorurkowej i w ślad za tym do wzrostu odporności na korozję, jak i poprawy bioaktywności [1]. Utworzenie nanorurkowej warstwy tlenkowej wskutek utleniania anodowego w elektrolitach zawierających jony fluorowe ma szczególne zalety. Po pierwsze, samoorganizująca się i uporządkowana warstwa nanorurkowa znacznie zwiększa chropowatość powierzchni w nanoskali, a komórki tworzące kość, czyli osteoblasty, wykazują lepszą tendencję do przylegania do takiej powierzchni, ze względu na jej podobieństwo do budowy tkanki kostnej pod względem chemicznym i morfologicznym. Dodatkowo można zwiększyć bioaktywność biomateriału Ti14Nb13Zr poprzez naniesienie na nanorurkową warstwę tlenkową cienkich powłok hydroksyapatytowych ( $\text{HA}$ ,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [2]. Hydroksyapatyt jest szeroko stosowany jako materiał na powłoki na implanty ortopedyczne i stomatologiczne ze względu na podobieństwo w budowie chemicznej i strukturalnej do naturalnej tkanki kostnej. Powłoka HA wykazuje zwiększoną adhezję do podłoża nanorurkowego poprzez lepsze zakotwiczenie w nanorurkach. Spośród wielu metod nanoszenia powłok HA na powierzchnię porowatego implantu można wymienić: osadzanie katodowe [3], metodę biomimetyczną [4], metodę zol-żel [5] oraz metodę zmiennego zanurzenia (ang. Alternative Immersion Method, AIM) [6]. W pracy przedstawiono wyniki nanoszenia powłoki HA na powierzchnię porowatego implantu Ti13Nb13Zr metodą biomimetyczną.

## Metodyka badań

Badaniom poddano stop Ti13Nb13Zr o porowatości 30%. Utlenianie elektroche-

# HYDROXYAPATITE COATING ON NANOTUBULAR OXIDE LAYER ON TITANIUM ALLOY

SYLWIA SOBIESZCZYK

GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,

11/12 NARUTOWICZA STR., 80-233 GDANSK, POLAND

MAILTO: SSOBIESZ@PG.GDA.PL

## Abstract

*Hydroxyapatite coating on porous alloy Ti13Nb13Zr deposited by biomimetic deposition method by immersing in a supersaturated simulated body fluid has been presented. Hydroxyapatite coating was deposited on nanotubular oxide layer, which was obtained by electrochemical oxidation in a solution containing fluoride ions.*

*[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 16-18]*

## Introduction

Porous titanium implants are load-bearing scaffolds for the newly created bone tissue. The disadvantage of titanium biomaterials is their weak osseointegration, in means of direct structural and functional connection with surrounding bone, thus requiring additional surface modification. Among many methods of surface modification of Ti alloys for implants, electrochemical methods are proposed, leading to nanotubular layer which aim to both increase the corrosion resistance and improve bioactivity [1]. The creation of nanotubular oxide layer due to anodic oxidation in electrolytes containing fluoride ions has many advantages. First of all, self-organizing and regular nanotubular layer greatly increases the surface roughness at the nanoscale and the bone-forming cells, osteoblasts, have higher tendency to adhere to the implant surface, due to its similarity to structure of bone, both chemically and morphologically. Additionally, bioactivity of Ti13Nb13Zr biomaterial can be increased by applying the thin hydroxyapatite coating (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) on nanotubular oxide layer [2].

Hydroxyapatite is widely used as coating material for orthopaedic and dental implants because of the chemical and structural similarity to the natural bone tissue. HA coating shows improved adhesion to nanotubular substrate by better anchoring in the nanotubes. There are many methods of HA coating on the surface of the porous implant, including: cathodic deposition [3], biomimetic method [4], sol-gel method [5] and Alternative Immersion Method (AIM) [6]. The results of the biomimetic deposition of HA coating on porous Ti13Nb13Zr alloy are presented in this paper.

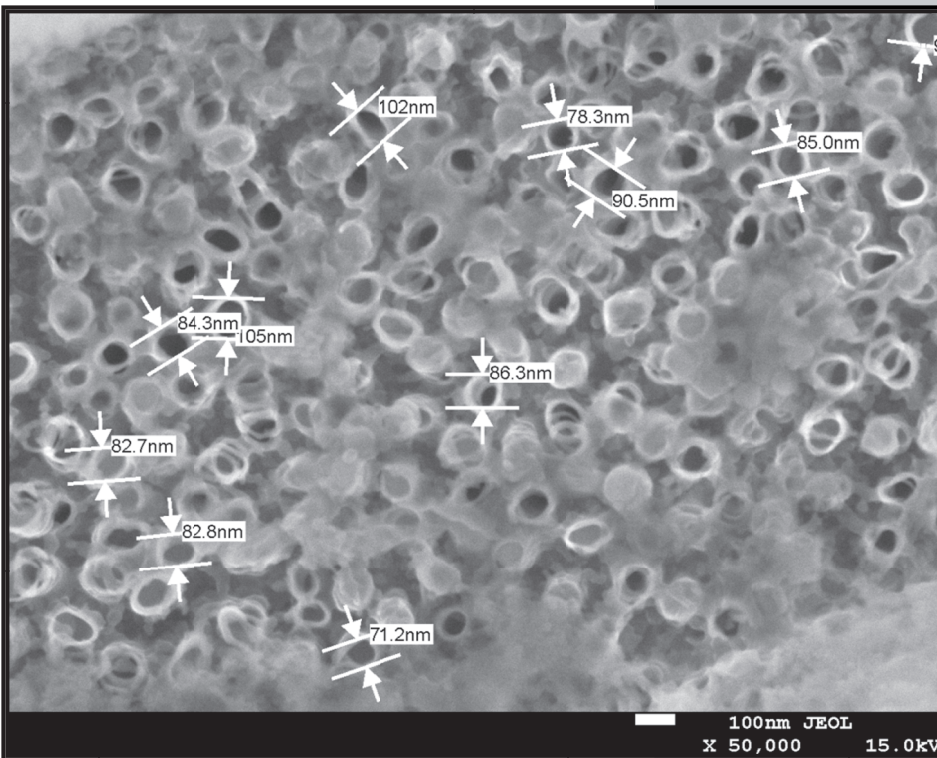
## Materials and methods

Porous Ti13Nb13Zr alloy with porosity of 30% were tested. Electrochemical oxidation was performed in a solution containing fluoride ions, 1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ +0,5wt.% HF. Oxidation was carried

**TABELA 1. Skład roztworu Ringera (wg normy ISO 16428:2005).**

**TABLE 1. The composition of Ringer's solution (in accordance to ISO 16428:2005).**

	NaCl	KCl	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{H}_2\text{O}$ destylowana $\text{H}_2\text{O}$ distilled
Skład ilościowy [g] Quantitative composition [g]	8,36	0,30	0,15	1000 ml



RYS. 1. Powierzchnia stopu Ti13Nb13Zr po utlenianiu i ekspozycji w roztworze Ringera przez okres 28 dni. x50 000.

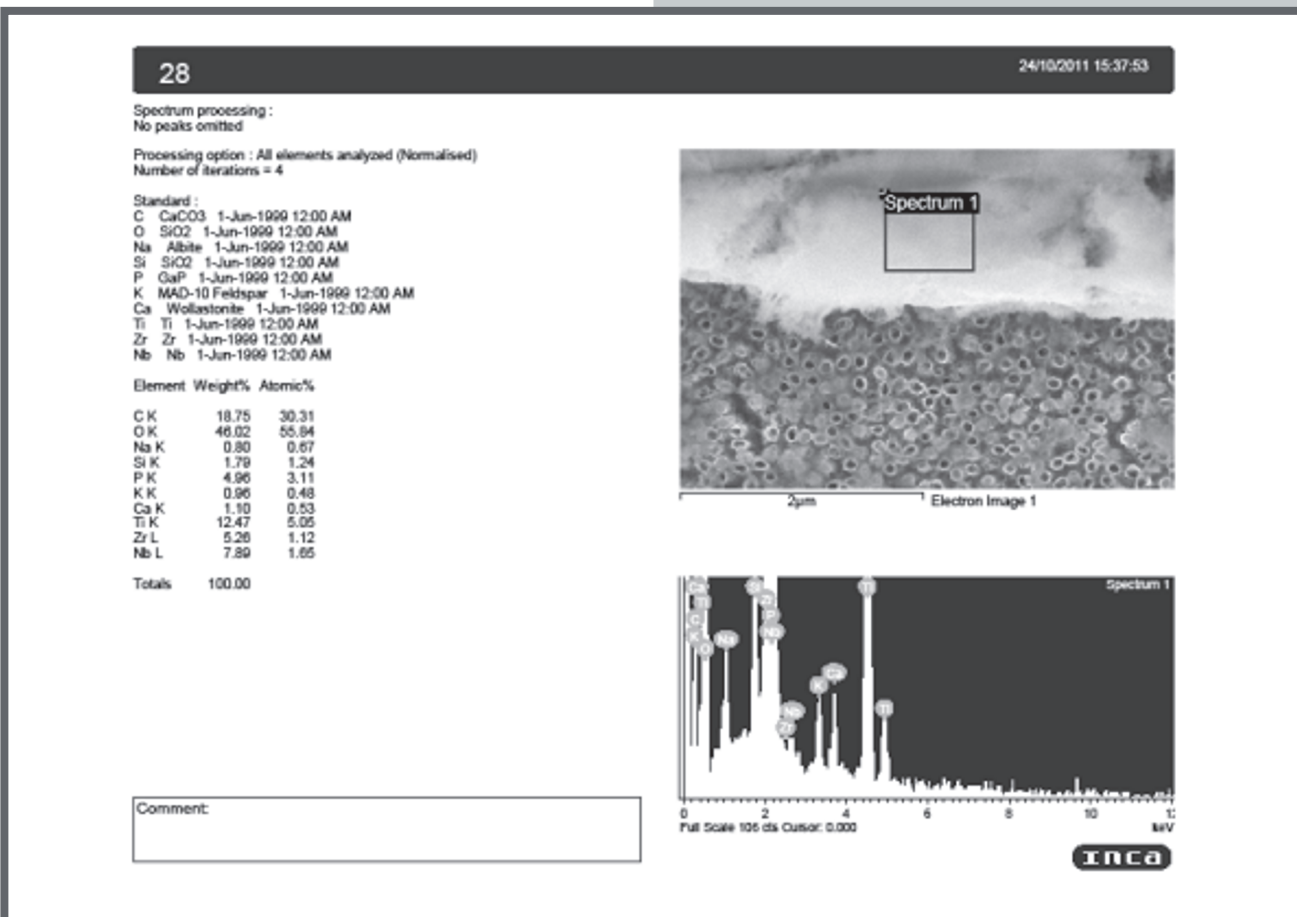
FIG. 1. Porous Ti13Nb13Zr after immersion in Ringer's solution for 28 days, magnification x 50 000.

out for 45 min. at 20 V and room temperature. After oxidation samples were annealed at 500°C for 2h in air atmosphere. In order to perform biomimetic deposition of hydroxyapatite coating Ringer's solution has been used, prepared in accordance with ISO 16428:2005 standard (TABLE 1). Samples were immersed in Ringer's solution for a period of 1, 7, 14 and 28 days. Microstructural assessment was performed using a scanning electron microscopy.

## Results and discussion

Oxidized samples of porous Ti13Nb13Zr alloy have been immersed in Ringer's solution. After removing from the solution, samples were subjected to analysis performed by scanning electron microscopy (SEM).

After 7 days of immersion, no indication of formation of calcium phosphate (CaP) on the nanotubular oxide surface was noticed, while for samples immersed in Ringer's solution for 28 days, there



RYS. 2. Analiza EDS dla próbki porowatej Ti13Nb13Zr z naniesioną powłoką HA.

FIG. 2. EDS analysis for porous Ti13Nb13Zr with hydroxyapatite layer.



miczne wykonano w roztworze zawierającym jony fluorowe, tj. 1M  $H_3PO_4 + 0,5\% \text{mas. HF}$ . Utlenianie prowadzono przez okres 45 min przy napięciu prądu 20V. Po utlenianiu próbki wygrzewano w temperaturze 500°C przez 2 godz. w atmosferze powietrza. W celu nałożenia powłoki hydroksyapatytowej metodą biomimetyczną zastosowano roztwór Ringera przygotowany zgodnie z normą ISO 16428:2005 (TABELA 1). Próbki zanurzono w roztworze Ringera na okres 1,7,14 i 28 dni.

Ocenę mikrostrukturalną wykonano za pomocą mikroskopu elektronowego skaningowego.

## Wyniki badań i dyskusja

Utlenione próbki porowate ze stopu Ti13Nb13Zr zanurzono w roztworze Ringera. Po 7 dniach nie zauważono wydzielania się fosforanów wapnia na powierzchni nanorurkowej, natomiast dla próbek przebywających w roztworze Ringera przez 28 dni widoczne są wyraźne wydzielania CaP, co zostało potwierdzone analizami EDS (RYS.1 i 2.). Stosunek molowy Ca/P wynosił 0,3.

W miarę zwiększania czasu zanurzenia próbek z tlenkową warstwą nanorurkową roztwór Ringera dostaje się do nanorurek wskutek działania kapilarnego, a na powierzchniach próbek pojawiają się charakterystyczne pęknięcia powłoki hydroksyapatytowej.

## Podziękowania

*Autorka składa podziękowania prof. Andrzejowi Zielińskiemu, liderowi Grupy Badawczej Bio-Nano-Med oraz kierownikowi Katedry Inżynierii Materiałowej i Spajania za pomoc w przeprowadzeniu badań i cenną dyskusję oraz prof. Elżbiecie Krasickiej-Cydzik z Uniwersytetu Zielonogórskiego za obserwacje mikroskopowe próbek.*

is a clear appearance of CaP, which was confirmed by EDS analysis (FIGS.1 AND2). The molar ration of Ca/P was 0.3.

As the immersion time of samples with nanotubular oxide layer in Ringer's solution increases, the solution gets into the nanotubes by capillary action and on the hydroxyapatite coating surface characteristic cracks appear.

## Acknowledgements

*The Author would like to thank prof. Andrzej Zieliński, leader of the Research Group Bio-Nano-Med and the head of the Department of Materials Science, for help in carrying out research and valuable discussion and Elżbieta Krasicka-Cydzik, Zielona Góra University, for conducting microscopic observations.*

## Piśmiennictwo

- [1] Sobieszczyk S., Klotzke R.: Nanotubular Ti oxide layers for enhancement of bone-implant bonding and bioactivity. Journal of Biomechanics, vol. 43, Supp.1 (2010) S10-S11.
- [2] Feng B., Chu X., Chen J., Wang J., Lu X., Weng J.: Hydroxyapatite coating on titanium surface with titania nanotube layer and its bond strength to substrate. J Porous Mater, vol.19, no 4 (2010) 453-458.
- [3] Chen S., Liu W., Huang Z., Liu X., Zhang Q., Lu X.: The simulation of the electrochemical cathodic Ca-P deposition process, Materials Science and Eng C 29 (2009) 108-114.

## References

- [4] Kunze J., Muller L., i in.: Porous titanium and silicon-substituted hydroxyapatite biomodification prepared by a biomimetic process: Characterization and in vivo evaluation. Electrochimica Acta 2009, 53, s.: 6995-7003.
- [5] Sobieszczyk S.: Hydroxyapatite coatings on porous Ti and Ti alloys. AMS, vol.10, no1 (2010) 19-28
- [6] Kodama A., Bauer S., Komatsu A., Asoh H., Ono S., Schmuki P.: Bioactivation of titanium surfaces using coatings of  $TiO_2$  nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite. Acta Biomaterialia vol.5, no 6 (2009) 2322-2330.

# GENEROWANIE NANOPORÓW W POLIMEROWEJ WARSTWIE ZABEZPIECZAJĄCEJ POWIERZCHNIĘ IMPLANTÓW METALOWYCH W KIERUNKU KONTROLOWANEGO UWALNIANIA LEKÓW

MONIKA GOLDA\*, ANDRZEJ KOTARBA

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, WYDZIAŁ CHEMII  
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLSKA  
\*MAILTO: GOLDA@CHEMIA.UJ.EDU.PL

## Streszczenie

W pracy przedstawiono badania składu chemicznego i morfologii próbek parylenu C modyfikowanego przy użyciu plazmy. Do badań zastosowano pomiary kąta zwilżania, spektroskopię fotoelektronów wzbudzonych promieniowaniem rentgenowskim (XPS) oraz mikroskopię sił atomowych (AFM). Stwierdzono wpływ oddziaływania plazmy na skład chemiczny i morfologię powierzchni badanych próbek.

**Słowa kluczowe:** parylen C, AFM, XPS, pomiar kąta zwilżania

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 19-21]

## Wprowadzenie

Częstą komplikacją po operacji wstawienia do organizmu pacjenta implantu metalowego jest wydłużony stan zapalny w ranie. Pomimo tego, że jest to nieuchronna konsekwencja uszkodzenia tkanek, chroniczny stan zapalny może powodować poważne komplikacje w integracji implantu z kością, a nawet rozwój nowotworu w tkance [1]. Rutynowa terapia takich komplikacji może być trudna, ponieważ wymaga podawania dużych dawek leków zarówno doustnie, jak i dożylnie [2]. Możliwym rozwiązaniem problemu jest kontrolowane uwalnianie leku z powierzchni implantu bezpośrednio do przylegającej tkanki. Pomimo intensywnych badań naukowych prezentujących wstępne próby wydłużonego uwalniania leku z różnych powierzchni np. tworzonych na powierzchni implantów tytanowych nanorurek z  $\text{TiO}_2$  [3], nie uzyskano pożądanej kinetyki podawania leku. Kontrolowane, domieszkowe uwalnianie leku jest atrakcyjną alternatywą dla doustnego, pozajelitowego, analnego i miejscowego podawania substancji leczniczych. Istnieje potrzeba uzyskania efektu terapeutycznego w konkretnie zlokalizowanym miejscu organizmu i umożliwienia uzyskania niezbędnego stężenia leku tylko w określonym miejscu, a nie ogólnoustrojowo. Jednocześnie, powierzchnie metalowych implantów można skutecznie zabezpieczać antykorozyjnie stosując warstwy polimerowe, takie jak parylen C (para-chloro-xylen, RYS.1) [4,5]. Warstwa polimerowa stanowi również dogodne podłoże do nadania jej funkcji kontrolowanego uwalniania leków. Celem badań było otrzymanie porowatej powierzchni parylenu C, o kontrolowanych

# GENERATION OF NANOPORES IN PROTECTIVE POLYMER LAYER ON METAL IMPLANTS SURFACE FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY

MONIKA GOLDA\*, ANDRZEJ KOTARBA

JAGIELLONIAN UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY  
3 INGARDENA STR., 30-060 KRAKOW, POLAND  
\*MAILTO: GOLDA@CHEMIA.UJ.EDU.PL

## Abstract

The paper reports a investigation on chemical composition and morphology of parylene C samples modified via plasma treatment. Various analytical methods, such as contact angles measurements, X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and atomic force microscope (AFM) were used. A significant effect of plasma treatment on chemical composition and polymer surface morphology was found.

**Keywords:** parylene C, AFM, XPS, contact angle measurement

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 19-21]

## Introduction

The most common post-operation complication after implantation is prolonged inflammation in wound. Although, it is an inevitable consequence of tissue injury, chronic inflammation can cause serious complications in implant-bone integration and predisposes tissue to cancer development [1]. Treatment of these complications systematically can be difficult, as it involves prolonged courses of high-dose intravenous and oral medicines [2]. Possible solution to this problem can be controlled drug delivery directly to the damaged tissue. Although several scientific papers present preliminary results of long-term drug elution from e.g.  $\text{TiO}_2$  nanotubes [3], none of them has reached the desired prolonged time of elution. Reducing the post operation side effects is therefore a major challenge for basic and applied scientific research. Controlled site-specific drug delivery offers an attractive, alternative to oral, parenteral, suppository and topical modes of administration. Site specific, controlled drug delivery is especially desirable where clinician wished to elicit localized therapeutic pharmaceutical effect. What is more, such delivery allows therapeutic doses at the desired site of action, while maintaining low or negligible systemic level. One of the strategies in this context is functionalization of the polymeric anticorrosive protective layer in order to serve as solid base for controlled drug delivery. One of the material used for this purpose is parylene C (para-chloro-xylylene, FIG.1), which was proved as anticorrosive protector of the metal implants surface [4,5]. The aim of this study was to obtain porous surface on parylene C films which can serve as drug reservoir and by its engineering help to control kinetic of drug delivery.

## Materials and methods

Parylene-C is a polymeric form of para-chloro-xylylene, which

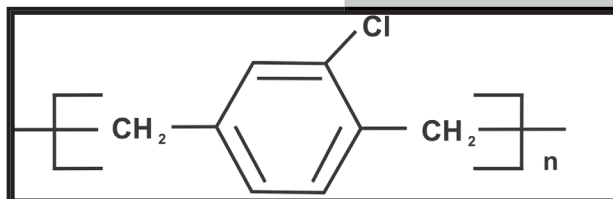


Fig. 1. Chemical formula of parylene C.  
Rys. 1. Wzór chemiczny parylenu C.

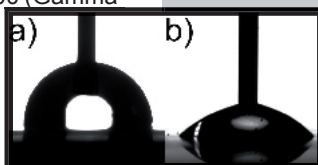
## Materiały i metody

Parylen-C jest polimerową formą para-chloro-xyleny, którego wzór chemiczny ( $C_8H_7Cl$ ) pokazano na RYS.1. Depozycja cienkich powłok na modelowej powierzchni implantu metalowego została wykonana za pomocą metody osadzania z fazy gazowej (CVD). W testach wykorzystano warstwy polimeru o grubości 8  $\mu m$ , która została dobrana ze względu na optymalne właściwości antykorozyjne i mechaniczne [4,5]. Do modyfikacji powierzchni parylenu C i stworzenia centrów aktywnych do przyłączania innych cząsteczek wykorzystano plazmę w atmosferze utleniającej. Eksperymenty modyfikacji powierzchni parylenu C przeprowadzono w urządzeniu Plasma System FEMTO Diener Electronics. Czas działania plazmy mieścił się w zakresie 0.1-60 min. do kontroli stopnia modyfikacji powierzchni wykorzystano pomiar kąta zwilżania wody destylowanej przy użyciu goniometru Krüss, model G10. Badania wykonano w temperaturze pokojowej, z igłą strzykawki w kontakcie z kroplą. Skład powierzchni był monitorowany przy pomocy spektroskopii fotoelektronów wzbudzonych promieniowaniem rentgenowskim (XPS) z analizatorem półsferycznym SES R4000 (Gamma-data Scienta). Źródłem promieniowania była lampa Mg K $\alpha$  (1486.6 eV) o mocy 350 W. Poziom próżni podczas pomiaru wdm wynosił ok.  $8 \times 10^{-10}$  mbar. Otrzymane widma analizowano przy użyciu programu Casa- XPS 2.3.10. Topografie modyfikowanych powierzchni obserwowano przy pomocy mikroskopu sił atomowych (AFM) Nanoscope V z kontrolerem MultiMode 8 $\text{®}$ , tapping-mode. Pomiarów dokonano przy użyciu ostrza RTESPA (40 N/m), szybkość obrazowania: ok. 1 Hz.

## Wyniki i dyskusja

Modyfikacja parylenu C prowadzi do zmian morfologii oraz składu chemicznego na powierzchni. Pomiary kąta zwilżania, wykazały obniżenie wartości parametru o 40% po 30min. działania plazmy. Na RYS. 2 porównano typowy pomiar kąta zwilżania dla wody destylowanej próbki referencyjnej (RYS.2a) i po modyfikacji (RYS.2b). Wyniki te wskazują jednoznacznie na znaczny wzrost hydrofilowości na pierwotnie hydrofobowej powierzchni parylenu C po działaniu plazmy. Dane uzyskane w trakcie pomiarów kąta zwilżania, pozostają w zgodności ze zmianą składu chemicznego monitorowaną metodą XPS. Profil zmian stężeń

monomer's chemical formula ( $C_8H_7Cl$ ) is shown in FIG.1. Deposition of the thin films was performed via Chemical Vapor Deposition (CVD). For the tests, 8  $\mu m$  films were used due to their excellent anticorrosion properties proved elsewhere [4]. In order to modify parylene C and create reactive sites for attachment of other compounds, polymer surface was treated with plasma of an oxidizing agent. A plasma system FEMTO (low-pressure plasma) manufactured by Diener Electronics was used. Time of plasma treatment was between 0.1-60 min. to check the modification of the hydrophilic properties contact angles of distilled water were measured with a Krüss goniometer, model G10. The experiments were performed under ambient conditions with the needle tip in contact with the drop. The surface composition was monitored by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analyses using an ultra high vacuum system equipped with SES R4000 (Gamma-data Scienta) analyzer. The un-monochromatic Mg K $\alpha$  source (1486.6 eV) operated at 350W was applied. The vacuum in the spectrometer chambers was better than  $8 \times 10^{-10}$  mbar. Collected XPS spectra were analyzed using Casa- XPS 2.3.10 software. The topography of the polymer surface was observed in tapping-mode with the use of atomic force microscope (AFM) Nanoscope V with MultiMode 8 $\text{®}$  controller. The AFM tip (RTESPA) with force constant of 40 N/m was applied, the scan rate was  $\sim 1$  Hz.

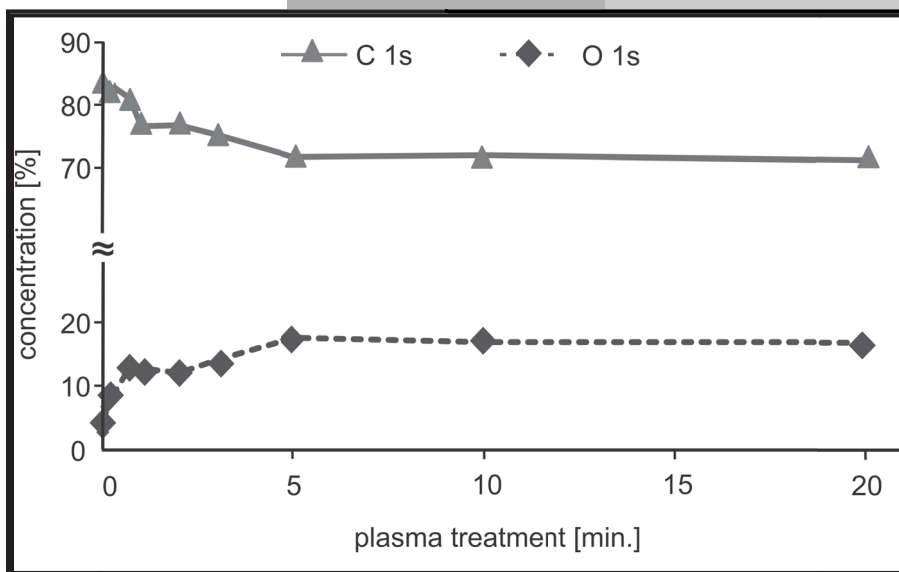


**Fig. 2 Typical results of contact angles measurements for distilled water on reference (a) and modified (b) samples of parylene C.**

**Rys. 2 Typowy wynik pomiaru kąta zwilżania dla wody destylowanej dla próbki referencyjnej parylenu C (a) i po jego modyfikacji (b).**

## Results and discussions

Performed analysis revealed substantial changes of both, morphology and chemical composition on the parylene C surface after plasma treatment. Macroscopic observation of the modified samples via contact angle measurements, demonstrated decrease of this parameter by 40% after 30 min. treatment. In FIG. 2 the comparison of typical contact angles measurements for distilled water on reference and modified samples is shown. This indicates the desired increase in hydrophilicity of the parylene C surface after plasma treatment. Results obtained during contact angle measurements are in line with the results obtained from XPS analysis. The profile of



**Fig. 3. The concentration profiles of carbon and oxygen in parylene C surface as a function of plasma treatment time.**

**Rys. 3. Profil zmian stężeń węgla i tlenu na powierzchni parylenu C w funkcji czasu działania plazmy.**

changes in carbon and oxygen concentrations as a function of time of plasma treatment show that relative oxygen amount increase, whereas carbon decreases, as shown in (FIG.3). At the initial stage of the treatment he changes are quite dynamic while after 10 min. the C and O concentrations reach the plateau. The modification of parylene C surface results also in morphology



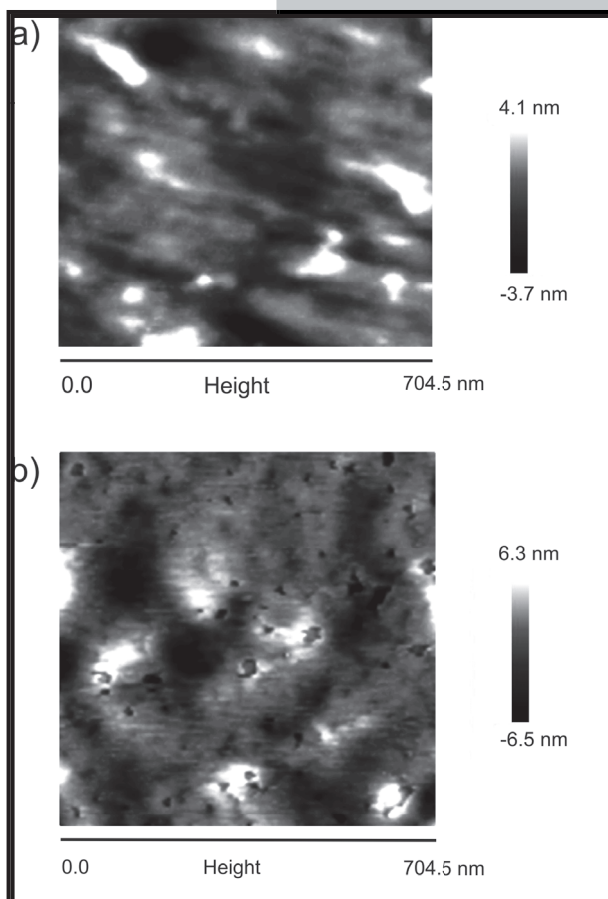
węgla i tlenu w funkcji czasu działania plazmy, wskazuje na wzrost względnej zawartości tlenu, a spadek stężenia węgla, w warstwie przypowierzchniowej, jak pokazano na RYS. 3. Obserwowane zmiany powierzchni zachodzą dynamicznie w początkowym okresie traktowania plazmą (do 10 min.), następnie stężenie C i O osiąga plateau. Jak dowiodły obserwacje mikroskopowe przy użyciu AFM, modyfikacja powierzchni parylenu C ma również wpływ na jej morfologię. Działanie plazmy prowadzi do wytworzenia porowatej powierzchni, której morfologię można kontrolować dobierając odpowiedni czas trawienia (RYS. 4). Na przykład, w trakcie początkowych 5 min. traktowania plazmą generowane są pory o szerokości 4-5 nm i głębokości 3-4.4 nm (RYS.4b). Taka struktura pozwala na kotwiczenie leków i kontrolowanie kinetyki ich uwalniania przy pomocy zmian parametrów plazmy (skład gazów, ciśnienie, czas ekspozycji).

## Wnioski

Modyfikacja powierzchni parylenu C (polimer biokompatybilny i antykorozyjny) może być wykonywana przy pomocy plazmy. Prowadzi ona do wbudowania tlenu w strukturę warstwy polimerowej i zmienia jej morfologię w skali nanoskopowej. Wprowadzone centra tlenowe mogą służyć jako kotwice do adsorpcji leków, które w połączeniu z inżynierią nanoporów tworzą odpowiednie podłoże do optymalizacji kinetyki uwalniania leków.

## Podziękowania

Autorzy dziękują K. Szaciłowskiemu oraz P. Cyganikowi za umożliwienie przeprowadzenia modyfikacji próbek przy użyciu plazmy oraz pomiarów kąta zwilżania.



**Fig. 4. AFM surface morphology of unmodified parylene C (a) and modified with plasma for 5 min. (b). Rys. 4. Obraz AFM morfologii powierzchni parylenu C niemodyfikowanego (a) oraz modyfikowanego plazmą przez 5 min. (b).**

changes, as revealed by AFM observations. The interaction with the plasma particles lead to porous structure formation, which morphology depends on the time of treatment (FIG. 4). For example, after 5 min., the pores of the width of 4-5 nm and depth of 3-4.4 nm are formed (FIG. 4b). Such structure allowed for anchoring of the drugs molecules which elution kinetics can be controlled by the plasma parameters (such as gas composition, pressure, exposure time).

## Conclusions

Surface modification of parylene C (biocompatible, anticorrosive polymer) can be successfully obtained via plasma etching. Such treatment changes the morphology in the nanoscale of the polymer and incorporates oxygen on its surface. Such surface oxygen species can serve as effective anchors for medicines adsorption which together with the nanopores engineering form a suitable playground for optimization of the drugs release kinetics.

## Acknowledgments

Authors would like to thank K. Szaciłowski and P. Cyganik for providing plasma generator and contact angle measurements.

## Piśmiennictwo

- [1] Eming S., Krieg T., Davidson J., Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127 (2007) 514-525
- [2] Gulati K., Ramakrishnan S., Aw M., Atkins G., Findlay D., Losic D. Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion. *Acta Biomaterialia* 8 (2011) 449-456
- [3] Mao D., Xiao X., Wang C., Tang H., Liu R., Anodic Oxidized Titania Nanotubes as Drug Delivery. *Adv Mater Res.* 335-336 (2011) 343-346

## References

- [4] Cieślak M., Engvall K., Pan J., Kotarba A., Silane-parylene coating for improving corrosion resistance of stainless steel 316L implant material. *Corrosion Science* 53 (2011) 296-301
- [5] Cieślak M., Zimowski Z., Gołda M., Engvall K., Pan J., Rakowski W., Kotarba A., Engineering of Bone Fixation Metal Implants Biointerface – Application of Parylene C as Versatile Protective Coating. *Mater Sci. Eng. C*. in press (2012)

## BADANIA WARSTWY WODNEJ ORAZ GRUP HYDROKSYLOWYCH W NANOKRYSTALICZNYCH HYDROKSYAPATYTYCH METODAMI SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI ORAZ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO

LUKASZ PAJCHEL, KAROLINA MARKOWSKA,  
WAŁAW KOŁODZIEJSKI

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,  
BANACHA 1, 02-091 WARSZAWA, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 22-23]

### Wstęp

Stoichiometryczny fosforan wapnia o wzorze chemicznym  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  jest uważany za materiał wzorcowy dla apatytów mineralnych. Biologiczne oraz syntetyczne apatyty są na ogół niestochiometryczne z powodu inkorporacji innymi jonami [1]. Apatyty są mineralną frakcją tkanki zębów oraz kości. Znajdują one zastosowanie w medycynie jako materiały bioceramiczne oraz implanty stomatologiczne. Powierzchnia kryształów zarówno w syntetycznych jak i biologicznych apatytach pokryta jest strukturalną warstwą wodną [2], która stanowi granicę pomiędzy frakcją mineralną i organiczną tkanek twardych. Ta uporządkowana warstwa wodna sprzyja wymianie jonów oraz wpływa na dojrzewanie kryształów hydroksyapatytów. Kryształy apatytów nanokrystalicznych są tak małe, że ich powierzchnia ma bardzo duży wpływ na wnętrze [3].

### Cel badań

Celem badań jest analiza zmian zachodzących w warstwie wodnej oraz strukturalnych grupach hydroksylo- wych apatytów z uwzględnieniem wielkości kryształów, w odniesieniu do różnych metod ich nawadniania oraz suszenia.

### Materiały i metody

Wyściowy syntetyczny hydroksyapatyt został zmie- lony w młynku kulowym na sucho. Kolejne próbki były mielone przez okres 0, 1, 3, 6, 12, 24 oraz 36 godzin. W zależności od czasu mielenia otrzy- mano serie hydroksyapatytów o wielkości kryształów w zakresie 20-100 nm. Każda uzyskana tak próbka została podzielona na dwie części. Pierwsza z nich była poddana działaniu wrzącej wody, a druga przegrzanej pary wodnej o temperaturze 393 K. Nawadnianie prowadzono przez 24h. Następnie każda z próbek została ponownie podzielona na dwie części. Pierwsza z nich została poddana liofilizacji przez okres 48h w liofilizatorze Christ's Alpha 1-2 LD plus. Druga była suszona przez okres 24h. Tak przygotowane próbki były analizowane metodą spektroskopii w podczer- wieni (IR). Badano wiązania rozciągające dla strukturalnych grup hydroksylo- wych przy liczbie falowej  $3571\text{ cm}^{-1}$ , oraz zginające wiązania dla cząsteczek wody przy liczbie falowej

## INFRARED SPECTROSCOPY AND NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE MEASUREMENTS OF WATER AND HYDROXYL GROUPS IN NANOCRYSTALLINE HYDROXYAPATITES

LUKASZ PAJCHEL, KAROLINA MARKOWSKA,  
WAŁAW KOŁODZIEJSKI

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, DEPARTMENT OF INORGANIC  
AND ANALYTICAL CHEMISTRY,  
1 BANACHA STR., 02-091 WARSAW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 22-23]

### Introduction

Stoichiometric calcium hydroxyapatite with the chemical formula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  is a reference compound of apa- tite minerals. Biological and synthetic apatites are usually nonstoichiometric because of ionic substitutions [1]. Apatites are mineral components of teeth and bones. In medicine, they are commonly used as constituents of bioceramics and dental implants. The crystal surface of synthetic and biological apatites is covered with a structured water layer [2]. It serves as an interface between mineral and proteina- ceous compartments of hard tissues. This structured water layer influences ion exchange and provides environment for evolution of the apatite material (ion mobility, adsorp- tion properties). In nanocrystalline apatites the crystals are so small that the crystal surface substantially affects the crystal interior [3].

### Aim

The aim of our study was to evaluate surface water layer and structural hydroxyl groups of apatites with vari- ous crystal sizes, subjected to various hydration and drying treatments.

### Material and methods

Samples of synthetic hydroxyapatite were ground, without any solvent added, for 0, 1, 3, 6, 12, 24 and 36 h in a ball mill. The resulting apatites were found nanocrystalline with the crystal dimensions in the 20 – 100 nm range, the size being dependent on the grinding time. Each sample was divided into two equal parts. The first part has been exposed to boiling water, while the latter has been exposed to water steam at 393 K. The experiments lasted 24 h. Each of the treated samples was then divided into two equal parts. The first one underwent lyophilisation for 48 h in Christ's Alpha 1-2 LD plus lyophilizator, while the latter underwent air dry- ing for 24 h. Such prepared samples were analyzed using infrared spectroscopy (IR). Stretching bands at  $3571\text{ cm}^{-1}$  from structural hydroxyl groups and water bending bands at  $1640\text{ cm}^{-1}$  were examined [4]. The samples were then studied using solid-state proton nuclear magnetic resonance (1H MAS NMR).

1640  $\text{cm}^{-1}$ . Następnie dla uzyskanych próbek wykonano eksperymenty protonowe metodą magnetycznego rezonansu jądowego w ciele stałym ( $^1\text{H}$  MAS NMR).

Wyniki: Otrzymane wyniki potwierdziły tezę, że proces mielenia wpływa na ilość wody znajdującej się na powierzchni kryształów jak i na liczbę strukturalnych grup hydroksylowych w ich wnętrzu. Mniejsze kryształy posiadają więcej wody na swojej powierzchni oraz mniej grup hydroksylowych we wnętrzu. Porównano także procesy nawodnienia przy pomocy wrzącej wody oraz pary wodnej a także procesy suszenia i liofilizacji. Zastosowanie kombinacji tych metod pozwala na otrzymanie hydroksyapatytu o pożądanej grubości warstwy wodnej.

## Wnioski

Udowodniono, że mielenie oraz zastosowanie różnych procesów nawadniania oraz suszenia pozwala uzyskać odpowiednie dla apatytów biomedycznych wielkości kryształów, warstwę wodną jak i liczbę grup hydroksylowych. Metody IR i  $^1\text{H}$  MAS NMR okazały się przydatne przy badaniu wnętrza oraz powierzchni kryształów apatytów.

## Results

The results showed that the grinding procedure influenced the amount of water feasible to be adsorbed on the crystal surface and the content of the structural hydroxyl groups located in the crystal lattice. The smaller crystal dimensions, the bigger was the amount of water absorbed on the apatite surface. Smaller crystals had also less hydroxyl groups in their internal structure. Hydration by boiling water and by water steam, and dehydration by lyophilization and by air drying were compared. It was found that adequate combination of those methods allows one to obtain apatite material with suitable surface water layer.

## Conclusions

We have proved that by dry milling and posterior adequate hydration/drying procedures it is possible to adjust the crystal size, surface water layer and content of structural hydroxyl groups in apatites designed for medical applications. The IR and  $^1\text{H}$  MAS NMR methods were found useful in the study of the crystal surface and crystal interior of nanocrystalline apatites.

## Piśmiennictwo

- [1] J.C. Elliot, *Studies in Inorganic Chemistry 18, Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [2] A. Kafiak, W. Kolodziejski, Complementary information on water and hydroxyl groups in nanocrystalline carbonated hydroxyapatites from TGA, NMR and IR measurements. *Journal of Molecular Structure* 990 (2011) 263-270.

## References

- [3] Sadło J., Pajchel L., Michalik J., Kolodziejski W., „EPR studies of radicals generated by c-radiation in nanocrystalline hydroxyapatites prepared by dry milling”, *Journal of Molecular Structure* 1022 (2012) 61–67.
- [4] Sadło J., Strzelczak G. Lewandowska-Szumiel M. Sterniczuk M., Pajchel L., Michalik J., “Carbon-centered radicals in c-irradiated bone substituting biomaterials based on hydroxyapatite”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* (in press).



## WSPOMAGANA PLAZMOWO METODA WYTWARZANIA POWŁOK CERAMICZNYCH Z AEROZOLU

PIETRZYK B\*, MISZCZAK S., SZYMANOWSKI H., GAWRONSKI Z.

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ  
STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

\*MAILTO: BOZENA.PIETRZYK@P.LODZ.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 24-26]

Metoda zol-żel jest szeroko stosowana jako sposób wytwarzania proszków, powłok, i materiałów litych o różnych zastosowaniach, także biomedycznych. Niemniej jednak, jako technologia chemiczna z udziałem fazy ciekłej, podlega związanym z tym ograniczeniom co do możliwości praktycznego zastosowania, szczególnie w przypadku wytwarzania powłok na podłożach o złożonej geometrii lub porowatych. Wykorzystanie zwykle stosowanych w metodzie zol-żel technik nanoszenia zolu, jak dip-coating czy spin-coating, sprawia w tych przypadkach trudności. Rozwiązaniem może być wówczas nanoszenie z użyciem techniki aerosol-żel [1-3]

W pracy przedstawiona została nowatorska metoda wytwarzania powłok z aeroszolu, ze wspomaganie plazmowym. Nowością tej metody jest integracja techniki nanoszenia aerosol-żel oraz plazmowego wyładowania jarzeniowego do obróbki powierzchni. Cały proces, zarówno depozycji z aerosol-żel jak i wyładowania plazmowego, jest przeprowadzany w jednym reaktorze. Schemat budowy tego reaktora jest przedstawiony na RYS. 1.

Plazma niskotemperaturowa jest wykorzystywana w wielu procesach wytwarzania powłok jako źródło materiału budującego powłokę (metody PACVD i PECVD) [4]. W prezentowanym przypadku, niskotemperaturowe wyładowanie plazmowe jest wykorzystywane do czyszczenia i aktywacji podłoża przed depozycją powłoki. Sam proces nanoszenia powłoki z aeroszolu zachodzi w następnym etapie, przy ciśnieniu atmosferycznym, z użyciem gazu nośnego. Po etapie depozycji, wyładowanie plazmowe może być ponownie użyte do obróbki naniesionej powłoki.

Przy użyciu opisanego reaktora zostały wytworzone cienkie powłoki ceramiczne  $\text{TiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  w różnych wariantach obróbki plazmowej i cieplnej. Jako podłoża użyte zostały cienkie ( $\sim 0,3\text{mm}$ ) monokrystaliczne [100] płytki krzemowe. Preparatyka zoli została oparta na roztworach prekursorów metaloorganicznych: butanolanu tytanu w etanolu oraz izopropanolanu aluminium w wodzie. Lepkość uzyskanych zoli, zawierająca się w zakresie  $1\div 2\text{ mPa}\cdot\text{s}$ , dobrano tak, by uzyskać najbardziej efektywne wytwarzanie mgły aeroszolowej. Gazem nośnym, wykorzystanym podczas depozycji z aeroszolu, był argon. Obróbka w wyładowaniu plazmowym była prowadzona z wykorzystaniem plazmy tlenowej, przy różnych mocach wyładowania ( $100\div 400\text{W}$ ) i czasach ( $3\div 8\text{ min}$ ). Konwencjonalna obróbka cieplna była prowadzona w piecu muflowym, w temperaturze  $500^\circ\text{C}$ .

W pracy zbadany został wpływ warunków wytwarzania oraz obróbki cieplnej i plazmowej na morfologię i budowę chemiczną

## PLASMA ENHANCED AEROSOLGEL DEPOSITION OF CERAMIC COATINGS

PIETRZYK B\*, MISZCZAK S., SZYMANOWSKI H., GAWRONSKI Z.

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY  
1/15 STEFANOWSKIEGO STR., 90-924 LODZ, POLAND  
\*MAILTO: BOZENA.PIETRZYK@P.LODZ.PL

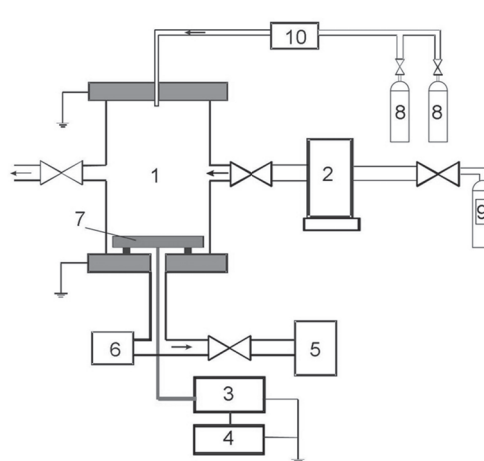
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 24-26]

The sol-gel process can be used for fabrication of numerous powders, coatings and bulk materials for different applications, including biomedical. Despite this, as a wet-chemical technique, it has some limitations related with properties of liquid colloidal solution, especially when applying on substrate as a coating. The most frequently used methods, such as dip- and spin-coating, are difficult to apply on more complex substrates. In these cases, aerosol-gel deposition method can be solution for this problem [1-3]

In this paper a new plasma enhanced aerosol-gel method of coatings fabrication has been presented. A novelty of this method is an integration of thin films aerosol-gel deposition and plasma discharge surface treatment. Whole process, both aerosol-gel deposition and plasma treatment, can be carried out in one reactor. The design and operation scheme of such device is presented in FIG. 1.

Typically, low-temperature plasma is used in many manufacturing processes of coatings fabrication, acting as a source of coating material (PACVD and PECVD methods) [4]. In presented case, low-temperature plasma discharge is used to clean and activate the substrate surface before deposition stage. Main aerosol deposition process is conducted afterwards at atmospheric pressure, using carrier gas. Plasma discharge was also used for coatings treatment after their deposition.

Using described device, thin ceramic coatings of  $\text{TiO}_2$  and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  were deposited on substrates, plasma and/or heat treated, and investigated for their properties. Thin ( $\sim 0,3\text{mm}$ ) silicon wafers [100] were used as a substrates. For the preparation of sols, titanium (IV) butoxide in ethanol and aluminium isopropoxide in water solutions were used. Viscosity of obtained sols, in range  $1\div 2\text{ mPa}\cdot\text{s}$ , was adjusted for most



Schemat reaktora:

- 1 – komora reaktora
- 2 – generator aeroszolu z elementem piezoelektrycznym
- 3 – generator RF
- 4 – układ dopasowania
- 5 – pompa próżniowa
- 6 – sonda ciśnienia
- 7 – elektroda
- 8 – gazy robocze wyładowania plazmowego
- 9 – gaz nośny do depozycji z aeroszolu
- 10 – przepływomierz

RYS. 1. Schemat budowy reaktora aerosol-żel ze wspomaganie plazmowym.

FIG. 1. Schematic diagram of plasma enhanced aerosol-gel deposition reactor.

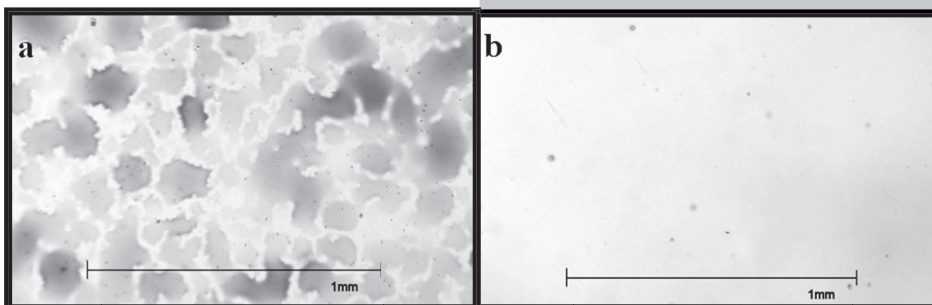
na powłok tlenkowych. Stwierdzono, że zarówno parametry depozycji z aerozolu, jak i obróbka cieplna i plazmowa, mają znaczny wpływ na właściwości otrzymanych powłok.

Na RYSUNKACH 2 i 3 przedstawiono wpływ parametrów nanoszenia z aerozolu oraz obróbki plazmowej podłoża na morfologię powłok  $\text{TiO}_2$  i  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Wydłużenie czasu depozycji z aerozolu powoduje wygładzenie powierzchni powłoki, głównie wskutek zwiększenia jej grubości (RYS.2b). Użycie wyładowania plazmowego do modyfikacji podłoża

przed osadzaniem powłoki daje podobne rezultaty (RYS.3b) bez konieczności wydłużenia czasu depozycji i związanego z tym zwiększania grubości powłoki. Prowadzi to do konkluzji, że oddziaływanie wyładowania plazmowego oczyszcza i aktywuje powierzchnię próbek, ułatwiając formowanie równomiernej powłoki podczas depozycji z aerozolu.

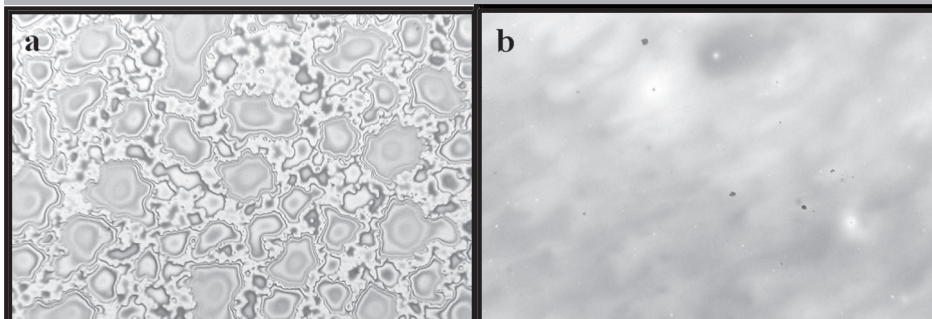
Obróbka w wyładowaniu plazmowym oraz obróbka cieplna po etapie depozycji z aerozolu mają z kolei silny wpływ na budowę chemiczną powłok. RYS. 4 przedstawia widma FTIR powłok  $\text{Al}_2\text{O}_3$  osadzanych z aerozolu bez obróbki, po obróbce w wyładowaniu plazmowym o mocy 300W, wygrzewanej w temperaturze 500°C oraz wygrzewanej w 500°C po poprzedniej obróbce w wyładowaniu plazmowym o mocy 300W.

Zakres od 3000  $\text{cm}^{-1}$  do 3700  $\text{cm}^{-1}$  to pasma pochodzące głównie od wody zaadsorbowanej w powłoce. Intensywność tego pasma zmniejsza się po wygrzewaniu, co świadczy o usuwaniu zaadsorbowanej wody. W zakresie 2700-3100  $\text{cm}^{-1}$  widoczne są niewielkie pasma związane z absorpcją drgań grup organicznych typu



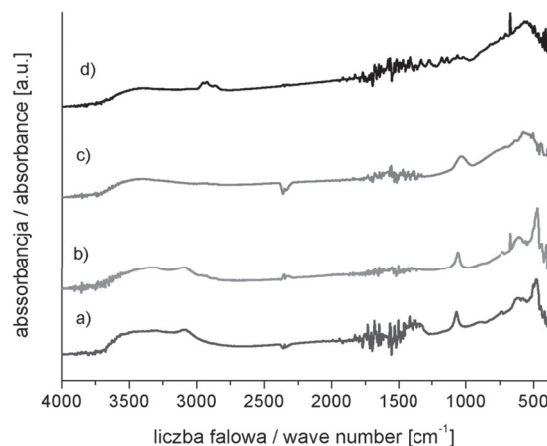
**RYS. 2. Porównanie morfologii powłok  $\text{TiO}_2$  nanoszonych przy różnych czasach depozycji z aerozolu: a – 1 minuta, b – 4 minuty.**

**FIG. 2. Comparison of  $\text{TiO}_2$  coatings morphology at different times of aerosol deposition: a – 1 minute, b – 4 minutes.**



**RYS.3. Porównanie morfologii powłok  $\text{Al}_2\text{O}_3$ : a – bez obróbki plazmowej, b – ze wstępną obróbką plazmową podłoża (plazma tlenowa, 5  $\text{cm}^3/\text{min}$ ., 200 W,  $1 \cdot 10^{-2}$  hPa, 3 minuty).**

**FIG.3. Comparison of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  coatings morphology: a – without plasma discharge pre-treatment, b – with plasma discharge pre-treatment (oxygen, 5  $\text{ccm}/\text{min}$ ., 200W,  $1 \cdot 10^{-2}$  hPa, 3 minutes).**



**RYS. 4. Widma FTIR powłok  $\text{Al}_2\text{O}_3$  naniesionych z aerozolu: a) bez obróbki plazmowej i cieplnej, b) po obróbce w wyładowaniu plazmowym o mocy 300W, c) po obróbce cieplnej w 500°C, d) po obróbce w wyładowaniu plazmowym o mocy 300W a następnie obróbce cieplnej w 500°C.**

**FIG. 4. FTIR spectra of alumina aerosol-gel coatings: a) without plasma or heat treatment, b) after treatment in a 300W plasma discharge, c) after heat treatment at 500°C, d) after 300W plasma discharge combined with 500°C heat treatment**

effective ultrasonic spraying. Argon was used as the carrier gas during deposition. The plasma treatment stage was conducted using oxygen at different discharge power (100÷400W) and time (3÷8 minutes). Conventional heat treatment was carried out in a furnace at temperature of 500°C.

The influence of aerosol-gel deposition conditions and plasma discharge on morphology and chemical structure has been studied. It was found that deposition parameters as well as plasma and heat treatment have significant influence on coatings properties.

The influence of plasma pre-treatment and aerosol deposition parameters is clearly visible in morphology of obtained coatings (FIG. 2 and FIG. 3). Longer deposition time results in smoothing of coatings surface (FIG. 2b), mainly due to increasing its thickness. The use of plasma discharge leads to the same effect (FIG. 3b) without necessity of extending of the deposition time and coating thickness. This leads to conclusion, that plasma activates the surface of the substrate and facilitates the formation of coating from aerosol spray.

Plasma and heat treatment after aerosol deposition have strong influence on the chemical structure of coatings. FIGURE 4 shows the FTIR spectra of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  coatings deposited from an aerosol without treatment (a), after treatment in a 300W plasma discharge (b), heat treated at 500°C (c), and 300W plasma discharge combined with 500°C heat treatment (d). Spectral

range from 3000  $\text{cm}^{-1}$  to 3700  $\text{cm}^{-1}$  is derived mainly from water adsorbed in the coating. The intensity of this band decreases after annealing, indicating removal of adsorbed water. In the 2700÷3100  $\text{cm}^{-1}$  range there are visible small

CHx pochodzących z prekursorów służących do przygotowania zolu. Obróbka plazmowa nie powoduje ich usunięcia ze struktury powłoki, natomiast wygrzanie powłok powyżej 300°C powoduje zanik pasm pochodzących od tych grup.

Zakres pasm typowych dla  $\text{Al}_2\text{O}_3$  zawiera się w przedziale 400-1100 $\text{cm}^{-1}$ . Dla powłoki bez obróbki cieplnej, oraz obrabianej w wyładowaniu plazmowym widoczne są w tym zakresie trzy silne pasma absorpcji dla 1070, 616 i 482  $\text{cm}^{-1}$  typowe dla struktury bohemitu  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , czyli uwodnionego tlenku glinu [5], co oznacza że obróbka plazmowa w badanym zakresie mocy (100÷400W) nie powoduje istotnych zmian w strukturze chemicznej powłok. W strukturze powłoki wygrzewanej w 500°C widoczne jest szerokie pasmo w zakresie poniżej 1000  $\text{cm}^{-1}$  z maksimami dla 500 i 800  $\text{cm}^{-1}$  związanymi z  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  [6], natomiast pasmo 1070  $\text{cm}^{-1}$  ulega poszerzeniu i przesunięciu do 1060  $\text{cm}^{-1}$ . Pasma to pochodzą od wiązań Si-O-Al [7], które mogą powstać podczas wygrzewania powłoki  $\text{Al}_2\text{O}_3$  na aktywowanym plazmowo podłożu krzemowym. Nie jest ono widoczne w strukturze powłoki obrabianej plazmowo a następnie wygrzewanej, co świadczy o „uszczelnieniu” powłoki. Jednoczesne występowanie pasm pochodzących od grup typu CHx może wskazywać, że oddziaływanie plazmy obejmuje jedynie powierzchnię powłoki.

Przedstawiona metoda wytwarzania powłok ceramicznych polegająca na połączeniu w jednym reaktorze możliwości plazmowej obróbki podłoża, osadzania powłoki z aerozolu i obróbki plazmowej osadzonej powłoki stwarza nowe możliwości kształtowania właściwości powłok ceramicznych wytwarzanych metodą zol-żel zarówno w zakresie morfologii jak i budowy chemicznej.

## Podziękowania

*Praca została zrealizowana w ramach grantu badawczego nr N N508 593539.*

absorption bands associated with vibrations of organic groups from the CHx-type precursors, used for sols preparation. Plasma discharge treatment doesn't remove them from the coating structure, but heat treatment at temperatures above 300°C causes the disappearance of the bands derived from these groups.

The scope of the typical absorption bands of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  is in the range from 400 to 1100 $\text{cm}^{-1}$ . For the coating without heat treatment, and treated in a plasma discharge, three strong bands can be seen in this area: 1070, 616 i 482  $\text{cm}^{-1}$ , that are typical for boehmite  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  structure [5]. This means that the plasma discharge treatment in the tested power range (100÷400W) did not cause a significant change in the chemical structure of coatings. For the coating heat treated at 500°C, broad band below 1000 $\text{cm}^{-1}$  with maxima at 500 i 800 $\text{cm}^{-1}$  connected with  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  bands [6] can be seen whereas 1070 $\text{cm}^{-1}$  band, expanded and shifted to 1060 $\text{cm}^{-1}$ . This band comes from Si-O-Al bonds [7], which may arise during the heating of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  coatings on plasma-activated silicon substrate. Si-O-Al band is not seen in the structure of coating treated with plasma discharge combined with 500°C heat treatment. This may be a consequence of coating's sealing. At the same time, the presence of absorption bands originating from the CHx type groups may indicate, that the plasma discharge affects only the surface of the coating.

Presented method of producing ceramic coatings creates new opportunities to develop of their properties for different applications. Combining in a single reactor: plasma treatment of the substrate, deposition from aerosol, and plasma treatment of deposited coatings, allows to control morphology and chemical structure of obtained coatings.

## Acknowledgments

*This work was financially supported by research grant nr N N508 593539.*

## Piśmiennictwo

- [1] Manso M., Ogueta S.; García P., Pérez-Rigueiro J.: Mechanical and in vitro testing of aerosol-gel deposited titania coatings for biocompatible applications. *Biomaterials* 23 (2002) 349-356.
- [2] Langlet M., Vautey C: Influence of the Deposition Parameters on the Characteristics of Aerosol-Gel Deposited Thin Films. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* Volume 8 (1997) 347-351.
- [3] Langlet M.; Vautey C.; Mazeas N.: Some aspects of the aerosol-gel process. *Thin Solid Films* 299 (1997) 25-32.
- [4] Grill A.: *Cold Plasma in Materials Fabrication: From Fundamentals to Applications*; Wiley - IEEE Press, 1994.

## References

- [5] Langlet M.; Trejo-Valdez M.; Soppera O.; Crouxé-Barghorn, C.: Photoinduced processes in Aerosol-gel deposited ormosil films. *Thin Solid Films* Volume 472 (2005), pp. 253-260.
- [6] Shek C.H., Lai J.K.L., Gu T.S., Lin G.M.: Transformation evolution and infrared absorption spectra of amorphous and crystalline nano- $\text{Al}_2\text{O}_3$  powders. *Nanostructured Materials* 8 (1997) 605-610.
- [7] Oréfiice R.L.; Vasconcelos W.L.: Sol-Gel Transition and Structural Evolution on Multicomponent Gels Derived from the Alumina-Silica System. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 9 (1997) 239-249.



## OCENA BIOKOMPATYBILNOŚCI KOMPOZYTÓW NA BAZIE CHITOSANU DO STOSOWANIA W INŻYNIERII TKANKOWEJ KOŚCI

AGATA PRZEKORA\*, KAROLINA WÓJTOWICZ, GRAŻYNA GINALSKA

UNIwersytet Medyczny w Lublinie,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII,  
UL. W. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN, POLSKA  
\*MAILTO: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 27-28]

Głównym składnikiem części mineralnej kości i zębów jest hydroksyapatyt (HAp). Ceramika wapniowo-fosforowa w formie granul, jak i porowatego rusztowania jest materiałem powszechnie stosowanym jako substytut tkanki kostnej w ortopedii i stomatologii [1-3]. W celu polepszenia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej hydroksyapatytu można wprowadzać do niego dodatkowy komponent organiczny np. polisacharydowy [4,5]. Właściwości biologiczne chitosanu sprawiają, że jest on idealnym polisacharydowym składnikiem kompozytów na bazie hydroksyapatytu. Chitosan jest szeroko stosowany w inżynierii tkankowej dzięki swoim charakterystycznym właściwościom, takim jak brak toksyczności, szybka biodegradacja, podatność na chemiczną i enzymatyczną modyfikację, stymulacja adhezji i proliferacji komórek oraz osteoinduktywność. W medycynie regeneracyjnej, kompozyty na bazie chitosanu często stosowane są w formie hydrożeli, implantów, czy rusztowań mających zdolność dostarczania leków, czynników wzrostu oraz komórek do miejsca implantacji [6].

Celem niniejszej pracy było określenie biokompatybilności 2 kompozytów na bazie chitosanu: składającego się z krylowego chitosanu i granul HAp (chitosan-HA Biocer) oraz składającego się z krylowego chitosanu i mieszaniny granul HAp /TCP (chitosan-HT Biocer). Kryłowy chitosan o dużej masie cząsteczkowej został uzyskany dzięki uprzejmości dr Anny Wojtasz-Pająk z Morskiego Instytutu Rybackiego w Gdyni. Granule HAp (HA Biocer) oraz granule HAp/TCP (HT Biocer) uzyskano dzięki uprzejmości Prezesa firmy Chema Elektromet Spółdzielnia Pracy Rzeszów Jarosława Proniewskiego.

Badania in vitro przeprowadzono z zastosowaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich płodowych osteoblastów (hFOB 1.19) pozyskanej z banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, England, UK). Cytotoksyczność biomateriałów oszacowano metodą pośrednią za pomocą płynnych ekstraktów uzyskanych przez umieszczenie kompozytów w pełnym podłożu hodowlanym w stosunku 0,1 g próbki/ml podłoża na 24 godziny w temperaturze 37°C (ISO 10993-5). Kontrolę negatywną cytotoksyczności stanowiło podłoże hodowlane inkubowane w takich samych warunkach, ale bez biomateriałów. Kontrolę pozytywną cytotoksyczności stanowił 0,1% roztwór fenolu. Żywotność komórek hFOB po 24, 48 i 72-godzinnej ekspozycji na działanie ekstraktów określono z użyciem 2 testów – MTT (ocena aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej) i LDH total (ocena liczby komórek przez pomiar aktywności całkowitej puli LDH obecnej w cytoplazmie po lizie komórek). Dodatkowo cytotoksyczność ekstraktów określono za pomocą standardowego testu LDH release, w którym dokonuje się pomiaru aktywności LDH uwolnionej do podłoża hodowlanego przez komórki z uszkodzonymi błonami plazmatycznymi. Oceny

## THE BIOCOMPATIBILITY ASSESSMENT OF CHITOSAN- BASED COMPOSITES FOR BONE TISSUE ENGINEERING

AGATA PRZEKORA\*, KAROLINA WÓJTOWICZ, GRAŻYNA GINALSKA

MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,  
1 W. CHODŹKI STR., 20-093 LUBLIN, POLAND  
\*MAILTO: AGATA.PRZEKORA@UMLUB.PL

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 27-28]

Hydroxyapatite is the main inorganic component of bones and tooth. Calcium phosphate ceramics in the form of granules and porous scaffolds are widely used as bone substitutes in dentistry and orthopedics [1-3]. In order to improve mechanical properties and surgical handiness of hydroxyapatite, an organic component e.g. polysaccharide can be added [4,5]. Biological properties of chitosan make this polysaccharide an ideal component of hydroxyapatite-based composites. Chitosan is extensively applied in tissue engineering because of its characteristic properties such as nontoxicity, rapid biodegradation, prone to chemical and enzymatic modification, stimulation of cell adhesion and proliferation and osteoinduction. In regenerative medicine, chitosan-based composites are often applied in the form of hydrogels, implants or scaffolds capable to deliver drug, growth factors and cells into implantation area [6].

The aim of this work was to evaluate the biocompatibility of 2 chitosan-based composites: consisting of krill chitosan and HAp granules (chitosan-HA Biocer) and consisting of krill chitosan and mix of HAp/TCP granules (chitosan-HT Biocer). High molecular weight krill chitosan was kindly obtained from Anna Wojtasz-Pająk from National Marine Fisheries Research Institute in Gdynia. HAp granules (HA Biocer) and HAp/TCP granules (HT Biocer) were obtained by courtesy of President of Chema Elektromet Spółdzielnia Pracy Rzeszów Jarosław Proniewski.

In vitro tests were carried out using normal human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19) obtained from ATCC (American Type Culture Collection, England, UK). Cytotoxicity was estimated indirectly by means of fluid extracts obtained by immersing the composites in fresh growth medium for 24 hours at 37°C (ISO 10993-5). The ratio between the sample weight and the volume of the extraction vehicle was 0,1 g/ml. Culture medium incubated in the same conditions but with no test material served as negative control of cytotoxicity. 0,1% phenol solution served as positive control of cytotoxicity. Viability of hFOB cells after 24, 48 and 72-hour exposure to the extracts was assessed by 2 methods – MTT (assessment of mitochondrial dehydrogenases activity) and LDH total (evaluation of cell number via total cytoplasmic LDH activity measurement after cell lysis). Additionally, cytotoxicity of extracts was estimated by standard LDH release test that allows for membrane damage assessment via measurement of LDH activity released into the medium. LDH total and WST-8 (assessment of mitochondrial dehydrogenases activity) tests were performed to evaluate cell adhesion into tested composites surface. Cell proliferation was evaluated after long term culture directly on biomaterials. After 16 days of culture, cells were stained with Draq5 and Hoechst 33342 fluorescence dye and observed under the confocal microscope. Moreover, biocompatibility was estimated via measurement of bone alkaline phosphate activity (b-ALP) – the marker of II stadium of osteoblast differentiation. To

adhezji komórek do powierzchni testowanych kompozytów dokonano za pomocą testów LDH total oraz WST-8 (ocena aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej). Proliferację komórek określono prowadząc hodowlę osteoblastów bezpośrednio na biomateriałach. Po 16 dniach hodowli, komórki barwiono barwnikiem fluorescencyjnym Draq5 oraz Hoechst 33342 i obserwowano ich wzrost przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Ponadto, biokompatybilność określono poprzez pomiar aktywności frakcji kostnej fosfatazy alkalicznej (b-ALP) – markera II stadium różnicowania osteoblastów. W tym celu hodowlę komórek linii hFOB 1.19 prowadzono bezpośrednio na biomateriałach w podłożu osteogennym przez okres 20 dni. Po 4,8,12,16 i 20 dniach oznaczono aktywność b-ALP poprzez pomiar ilości powstającego p-nitrofenolu (pNP).

Wyniki testów na oznaczanie cytotoksyczności jednoznacznie wykazały, że kompozyty chitosan-HA Biocer oraz chitosan-HT Biocer nie negatywnie wpływają na żywotność komórek linii hFOB 1.19 przez cały czas trwania doświadczenia. Testy LDH total oraz WST-8 wykazały, że powierzchnia kompozytu chitosan-HA Biocer bardziej sprzyja adhezji osteoblastów niż powierzchnia kompozytu chitosan-HT Biocer. Obserwacja w mikroskopie konfokalnym sugeruje, że komórki lepiej proliferują na powierzchni kompozytu chitosan-HA Biocer niż na powierzchni kompozytu chitosan-HT Biocer. Hodowla komórek bezpośrednio na biomateriałach w podłożu osteogennym wykazała, że kompozyty chitosan-HA Biocer oraz chitosan-HT Biocer powodują wzrost aktywności b-ALP w czasie. Osteoblasty rosnące na powierzchni kompozytu chitosan-HA Biocer wykazywały nieznacznie wyższą aktywność b-ALP w porównaniu do komórek kontrolnych rosnących na powierzchni płytki polistyrenowej. Natomiast osteoblasty rosnące na powierzchni kompozytu chitosan-HT Biocer wykazywały obniżoną aktywność b-ALP w porównaniu do kontroli.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć wniosek, że kompozyty chitosan-HA Biocer oraz chitosan-HT Biocer są nietoksyczne, biokompatybilne oraz wykazują właściwości osteoindukcyjne. Jednakże, warto zaznaczyć, że kompozyt chitosan-HA Biocer wykazuje nieznacznie większą biokompatybilność niż kompozyt chitosan-HT Biocer i jest bardziej odpowiedni do stosowania jako rusztowanie dla komórek w inżynierii tkankowej kości.

## Podziękowania

*Praca finansowana w ramach DS MNd 2. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w projekcie realizowanym zgodnie z umową nr POPW.01.03.00-06-010/09-00 w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi Priorytetowej I, Nowoczesna Gospodarka, Działanie 1.3. Wsparcie Innowacji.*

assess b-ALP activity, hFOB 1.19 cells were cultured directly on the biomaterials in osteogenic medium for 20 days. After 4, 8, 12, 16 and 20 days of culture, b-ALP activity was evaluated by measuring of p-nitrophenol (pNP) production.

The cytotoxicity tests results clearly showed that chitosan-HA Biocer and chitosan-HT Biocer composites do not affect cell viability throughout the full length of the experiment. LDH total and WST-8 tests revealed that chitosan-HA Biocer surface is more favorable to cell adhesion than surface of chitosan-HT Biocer composite. Confocal microscopic observation suggests that better cell proliferation is on the chitosan-HA Biocer surface than on the chitosan-HT Biocer surface. Cell culture experiment directly on the biomaterials in osteogenic medium showed that chitosan-HA Biocer and chitosan-HT Biocer composites provoke increase of b-ALP activity with time. Osteoblasts cultured on the surface of chitosan-HA Biocer composite revealed slightly higher b-ALP activity compared to the control cells cultured on polystyrene plate. Whereas, cells cultured on the surface of chitosan-HT Biocer composite showed decreased b-ALP activity compared to the control.

In summary, basing on the results, it can be concluded that chitosan-HA Biocer and chitosan-HT Biocer composites are nontoxic, biocompatible and have osteoinductive properties. However, it is worth to notice that chitosan-HA Biocer composite shows slightly greater biocompatibility than chitosan-HT Biocer composite and is more appropriate for bone tissue engineering application as cell scaffold.

## Acknowledgements

*This work was supported by financial support from DS MNd 2. The paper was developed using the equipment purchased within the agreement No. POPW.01.03.00-06-010/09-00 Operational Program Development of Eastern Poland 2007-2013, Priority Axis I, Modern Economy, Operations 1.3. Innovations Promotion.*

## Piśmiennictwo

- [1] Sopyan Y.I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 2007; 8: 116-123.
- [2] Aronov D., Karlov A., Rosenman G. Hydroxyapatite nanoceramics: Basic physical properties and biointerface modification. *Journal of the European Ceramic Society* 2007; 27: 4181-4186.
- [3] Belcarz A., Ginalska G., Zalewska J., Rzeski W., Ślósarczyk A., Kowalczyk D., Godlewski P., Niedźwiadek J. Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes gentamicin release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009; 89: 102-113.

## References

- [4] Belcarz A., Ginalska G., Polkowska I., Przekora A., Ślósarczyk A., Zima A., Paszkiewicz Z. Pilot clinical study of efficacy of flexible HAp-based composite for bone defects replacement. *Engineering of Biomaterials* 2010; 99-101: 16-18.
- [5] Tsiopis C., Panayiotou C. Preparation of cellulose-nano-hydroxyapatite composite scaffolds from ionic liquid solutions. *Carbohydrate Polymers* 2008; 74: 99-105.
- [6] Muzzarelli A.A.R. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 2009; 76: 167-182.(1997) 239-249.

# MODYFIKACJA WARSTWY WIERZCHNIEJ FOSFORANÓW WAPNIA POLIMERAMI BIODGRADOWALNYMI

MAGDALENA SZUBERT<sup>1\*</sup>, KATARZYNA ADAMSKA<sup>1</sup>,  
ADAM VOELKEL<sup>1</sup>, TOMASZ BUCHWALD<sup>2</sup>, MIROSLAW SZYBOWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA POZNAŃSKA, WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ,  
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ,  
PL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 5, 60-965 POZNAŃ, POLSKA

<sup>2</sup> POLITECHNIKA POZNAŃSKA, WYDZIAŁ FIZYKI TECHNICZNEJ,  
KATEDRA SPEKTROSKOPII OPTYCZNEJ,  
UL. NIESZAWSKA 13A, 60-965 POZNAŃ, POLSKA

\*MAILTO: MM.SZUBERT@GMAIL.COM

## Streszczenie

Celem pracy była modyfikacja warstwy wierzchniej biomateriałów ceramicznych należących do grupy fosforanów wapnia –hydroksyapatyt (HA) oraz  $\beta$ -fosforan trójwapniowy ( $\beta$ -TCP), a następnie określenie wybranych właściwości biologicznych otrzymanych materiałów. Jako modyfikatory zastosowano dwa polimery biodegradowalne: glikol poli(oksyetylenowy) (PEG) oraz polihydroksymaślan (PHB).

Pomyślność procesu modyfikacji potwierdzono za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FT-IR; ATR) oraz spektroskopii Ramana. Biomateriały przed modyfikacją oraz po modyfikacji poddano testom określającym ich zdolność do degradacji oraz narastania hydroksyapatytu. Test degradacji przeprowadzono zanurzając materiały w roztworze buforowym tris-HCl przez okres czterech tygodni, w ciągu których dokonywano pomiaru masy w odstępach tygodniowych. W celu zbadania zdolności wzrostu hydroksyapatytu na powierzchni materiałów, próbki inkubowano w płynie symulującym osocze krwi (SBF) w temperaturze 37°C przez miesiąc. Zmiany zachodzące na powierzchni badanych materiałów rejestrowano w odstępach tygodniowych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) oraz spektroskopii w podczerwieni.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że szybkość procesu degradacji (obliczona na podstawie procentowego ubytku masy) biomateriałów modyfikowanych zwiększyła się w przypadku hydroksyapatytu zarówno modyfikowanego PEG jak i PHB, natomiast w przypadku  $\beta$ -TCP szybkość ta była na porównywalnym poziomie w porównaniu do materiału wyjściowego. Analiza obrazów wykonanych z wykorzystaniem SEM wykazała widoczne zmiany w morfologii powierzchni modyfikowanych materiałów. Zmiany te mogą świadczyć o właściwościach osteoindukcyjnych tych biomateriałów.

**Słowa kluczowe:** hydroksyapatyt,  $\beta$ -fosforan trójwapniowy, modyfikacja warstwy wierzchniej, glikol poli(oksyetylenowy), polihydroksymaślan, bioaktywność.

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 29-32]

## Wprowadzenie

Ze względu na zdolność trwałego połączenia z żywą tkanką oraz zdolność do regeneracji kości [1,2], biomateriały ceramiczne, spośród wielu grup biomateriałów stosowanych w medycynie cieszą się dużym zainteresowaniem.

# SURFACE MODIFICATION OF CALCIUM PHOSPHATES BY BIODEGRADABLE POLYMERS

MAGDALENA SZUBERT<sup>1\*</sup>, KATARZYNA ADAMSKA<sup>1</sup>,  
ADAM VOELKEL<sup>1</sup>, TOMASZ BUCHWALD<sup>2</sup>, MIROSLAW SZYBOWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND ENGINEERING  
5 M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE SQ. 60-965 POZNAŃ, POLAND

<sup>2</sup> POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF TECHNICAL PHYSICS,  
CHAIR OF OPTICAL SPECTROSCOPY  
13A NIESZAWSKA STR., 60-965 POZNAŃ, POLAND

\*MAILTO: MM.SZUBERT@GMAIL.COM

## Abstract

The main aim of this study is surface modification of ceramic biomaterials, belong to calcium phosphates group- hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ - tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)- and furthermore selected biological properties of obtained materials is determined. Polyethylene glycol (PEG) and polyhydroxybutyrate (PHB) are used as modifiers.

The process of surface modification of biomaterials is confirmed by means of infrared spectroscopy (FT-IR; ATR) and Raman spectroscopy. In presented study the obtained powder materials are formed on pellets and incubated in SBF (simulated body fluids solution) at body temperature. Formation of apatite layer was evaluated by means of Scanning Electron Microscope (SEM). The degradation behavior was carried out at 37°C for up to 28 days at pH 7.4 using Tris-HCl solution, and is referred to as simulation solution testing. The samples were incubated for 7, 14, and 28 days for the both simulation solution testing, using triplicate samples.

The degradation testing of modified HA showed a higher weight loss compared with unmodified HA. In the case of  $\beta$ -TCP the degradation rate was in similar level before and after modification. SEM images of materials showed visible changes in all of biomaterials surfaces. This changes may suggest the ability to form HA and osteoinductive properties of materials.

**Keywords:** hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, surface modification, polyethylene glycol, polyhydroxybutyrate, bioactivity

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 29-32]

## Introduction

Ceramic biomaterials are mainly based on bioceramics calcium phosphates like hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP). These materials, due to their biological properties and structural similarity to human bone, teeth and enamel, have many applications in medicine, especially in: orthopedics, dentistry, maxillo-facial and plastic surgery [1,2]. HA is found in various forms: powder, dens or porous material or component of composites. These composites are made up of HA and metallic or polymer material [3]. HA is also applied as drug carrier, adsorbent in protein column chromatography, catalyst and ion exchanger [5, 6].

The most important attributes of HA and  $\beta$ -TCP are biological properties, such as high biocompatibility and bioactivity [4]. Due to these features bioceramic materials are



Biomateriały ceramiczne to głównie bioceramika oparta na fosforanach wapnia, do których należą sześciortofosforan (V) dwuwodorotlenek dziesięciowapnia, czyli hydroksyapatyt (HA) o wzorze sumarycznym  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  oraz dwuortofosforan (V) trójwapnia, czyli  $\beta$ -fosforan trójwapniowy ( $\beta$ -TCP) opisany wzorem  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [1,4-6,8]. Ze względu na swoje mineralogiczne podobieństwo do apatytu biologicznego, który stanowi podstawowy składnik kości i zębów materiały te charakteryzują się właściwościami materiałów implantacyjnych tzn. są biogodne, bioaktywne oraz osteokonduktywne [7,9]. Niestety materiały te posiadają również wady a do największych z nich należy słaba wytrzymałość mechaniczna zarówno HA jak i  $\beta$ -TCP [1-3, 5-9]. Podstawową różnicą pomiędzy tymi dwoma materiałami jest to, że  $\beta$ -TCP jest degradowalny a co za tym idzie również resorbowalny w organizmie żywym, natomiast HA nie posiada tej zdolności, ponieważ jest degradowalny tylko w formie porowatej. Pomimo bardzo dobrej biogodności oraz bioaktywności ceramika oparta na fosforanach wapnia znalazła dotychczas zastosowanie w substytucji ubytków kostnych w miejscach nie przenoszących znacznych obciążeń mechanicznych, zaś w miejscach obciążonych jedynie jako pokrycia na implantach metalicznych lub węglowych. Ze względu na niewystarczającą wytrzymałość mechaniczną oraz nieodpowiednią resorbowalność konieczna jest modyfikacja powierzchni tych materiałów, aby mogły być szerzej stosowane w nowoczesnej medycynie.

## Materiały i metody

Modyfikacje przeprowadzono poprzez zastosowanie chemicznej metody szczepienia cząstek modyfikatora na powierzchni biomateriału. Jako modyfikatory zastosowano dwa polimery z grupy biodegradowalnych tj.: glikol poli(oksytetylenowy) - PEG ( $M_n=1000$ , Sigma-Aldrich) oraz poli(hydroksymaślan) - PHB (Sigma-Aldrich). Modyfikacja z użyciem PEG jako modyfikatora jest reakcją dwuetapową, w której jako czynnik sprzęgający zastosowano heksametyleno diizocyanian. Natomiast cząstki PHB zostały przyłączone bezpośrednio do powierzchni biomateriału.

Proces modyfikacji na powierzchni biomateriałów został potwierdzony metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR), techniką ATR/FTIR - osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. Attenuated Total Reflectance, ATR) oraz spektroskopii Ramana.

Materiały proszkowe zostały sprasowane za pomocą tabletkarki umieszczonej pod prasą hydrauliczną o sile nacisku 4 MPa. Badanie zdolności do degradacji przeprowadzono zanurzając pastylki w roztworze buforowym tris-HCl, natomiast w celu obserwacji wzrostu warstwy apatytowej pastylki inkubowano w płynie symulującym osocze krwi (ang. Simulated Body Fluid, SBF) przygotowanym wg procedury opisanej przez Kokubo [7]. Inkubacje materiałów w roztworze tris-HCl oraz SBF przeprowadzono w temperaturze 37°C przez okres 30 dni. Podczas trwania testu zdolności narastania hydroksyapatytu na powierzchni biomateriałów co tydzień wymieniano SBF, aby zapewnić dopływ świeżych jonów. Materiały analizowano w odstępach tygodniowych, czyli po 7, 14, 21 oraz 28 dniach. Po upływie określonego czasu próbki były wyjmowane z roztworów, przemywane wodą destylowaną, suszone w temperaturze 60°C a następnie ważone. Każdy pomiar został wykonany trzykrotnie. Zmiany zachodzące na powierzchni materiałów obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.

considered as inert material in human body [1-4]. Moreover, HA and  $\beta$ -TCP are also resorbable in tissue. It is desired property in case of application in bone regeneration because applied material undergoes resorption and is replaced by new tissue [5-8,10]. Thus both types of ceramics are used in clinical practice for stimulation of bone ongrowth on cementless endo-prosthetic components [6,7]. However, weak mechanical properties (flexural strength and low fracture toughness) and inappropriate resorbability limit their use as individual biomaterials. For instance, it was shown, that HA resorbed too slowly in comparison to velocity of new cells restoration. This results in retained parts of HA after months and years after implantation and then bone regrowth is impaired. While, in case of  $\beta$ -TCP the resorption too fast. Then biomaterial scaffold disappear before new bone ongrowth [9]. Moreover, the major disadvantage of HA and  $\beta$ -TCP is weak mechanical strength, brittleness and facility to rupture. These properties limit the application of HA and  $\beta$ -TCP in modern medicine as individual biomaterial. Therefore, the modification of their surface is necessary. Modification of biomaterials allows manipulation of their properties in the desired direction. Therefore, due to modification process, it is possible to obtain biomaterial of improved properties.

## Materials and methods

In this study one of chemical modification methods name grafting is used. Two degradable polymers: polyethylene glycol ( $M_n=1000$ , Sigma-Aldrich) and poly(hydroxybutyrate) (Sigma-Aldrich) are used as a modifiers. In this method the connection between biomaterial and modifier could be direct or indirect. In the case of PHB the reaction belongs to indirect connection, but in case of PEG between HA and modifier, the coupling agent is necessary. As a coupling agent hexamethylene diisocyanate is used.

The modification process of HA and  $\beta$ -TCP surface is confirmed by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR, Vertex 70, Bruker), Attenuated Total Reflectance (ATR, Vertex 70) and Raman spectroscopy (Renishaw).

The bioactivity of obtained materials specimens was evaluated by examining the apatite formation on their surfaces in SBF. SBF was prepared according to the procedure described by Kokubo [7]. Nonsterilized, pellets with the size of 2 mm in thickness, 13 mm in diameter were then soaked in 30 mL of SBF at 37°C for 7, 14, 21, and 28 days with change the solution after each week during soaking time. After soaking, specimens were removed from the SBF solution, gently rinsed with deionized water, and dried at 60°C. Scanning electron microscopy (SEM, Evo) are used to monitor the morphology of apatite formed on the biomaterials surfaces. Degradation test is performed at pH 7.4 using Tris-HCl solution without solution replacement at 37°C. The samples are incubated for 7, 14, 21 and 28 days using triplicate samples.

## Results and discussions

FIGURE 1 shows FT-IR spectra of unmodified HA, HA modified by PHB and also spectrum of modifier (PHB). All of the signals characteristic for groups of poly(hydroxybutyrate) were detected in the spectrum of modified material (FIG.1 (2)). The most intense band was found for carbonyl group ( $\text{C}=\text{O}$ ) at approximately  $1600\text{ cm}^{-1}$  wavenumber. Furthermore, the twin peaks at 2934-2857 and also 1479-1462  $\text{cm}^{-1}$  belong to the aliphatic hydrocarbons ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}$ ) stretching and bending vibrations respectively. The band at  $3500\text{ cm}^{-1}$  signal from the stretching vibrations characteristic

## Wyniki i dyskusja

Na RYS. 1 przedstawiono widma FT-IR modyfikatora, czyli PHB (a), HA niemodyfikowanego (b) oraz HA modyfikowanego PHB (c) wraz z zaznaczonymi charakterystycznymi pasmami. Modyfikacja HA za pomocą PHB przebiegła pomyślnie, gdyż w widmie HA+PHB (RYS.1c) widoczne są pasma pochodzące zarówno od HA jak i od PHB.

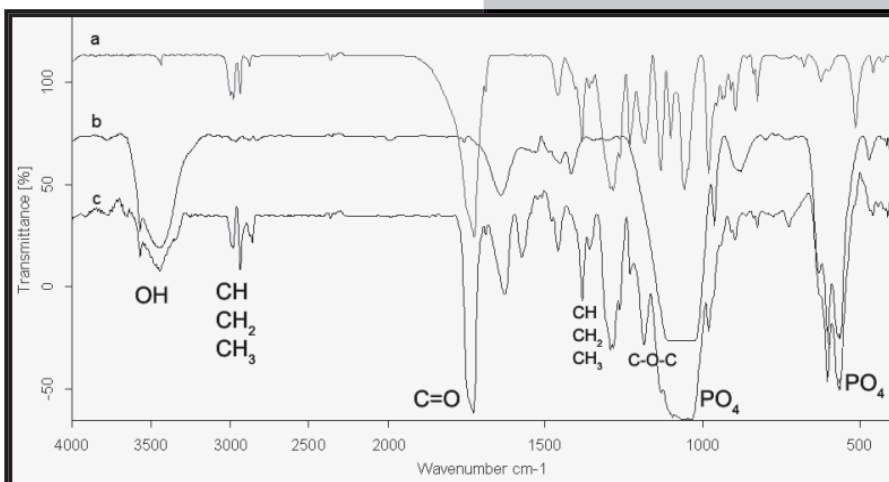
RYSUNEK 2 przedstawia zdjęcia SEM hydroksyapatytu modyfikowanego PEG przed oraz po zanurzeniu w SBF. Najbardziej widoczne zmiany

zachodzące na powierzchni materiału zaobserwowano po 21 dniach (RYS.2 (c)). Na podstawie obrazów SEM przypuszcza się, że po 21 dniach rozpoczyna się proces wzrostu hydroksyapatytu, który jest kontynuowany, na co wskazuje RYS.2 (d). Zdolność do narastania hydroksyapatytu na powierzchni biomateriału świadczy o bioaktywności oraz właściwościach osteoindukcyjnych tych materiałów.

## Wnioski

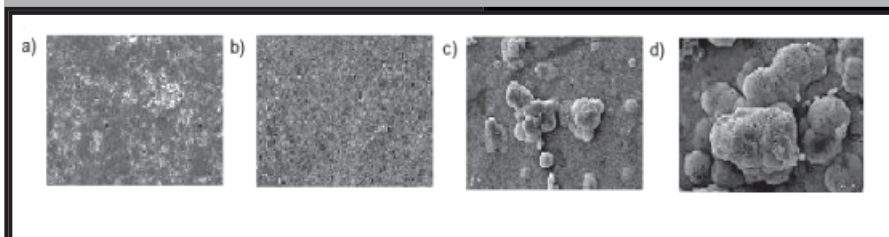
Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

- Warstwa wierzchnia  $\beta$ -TCP oraz HA została zmodyfikowana przez dwa biodegradowalne modyfikatory (PEG oraz PHB). Świadczą o tym widma otrzymane metodami spektroskopowymi FT-IR, FT-IR/ATR oraz Ramana.
- Szybkość procesu degradacji, po modyfikacji HA wzrosła po zastosowaniu obu modyfikatorów, natomiast w przypadku  $\beta$ -TCP została na podobnym poziomie co przed modyfikacją.
- Zmiany zaobserwowane na zdjęciach SEM są widoczne dla wszystkich badanych materiałów.
- Najbardziej znaczące zmiany, mogące świadczyć o zdolności do wzrostu HA zaobserwowano na powierzchni HA modyfikowanego PEG oraz PHB.
- Widma wykonane po inkubacji materiałów w roztworze tris-HCl oraz SBF potwierdzają zmiany zachodzące na powierzchni biomateriałów.



RYS. 1. Widmo FT-IR PHB (a) HA niemodyfikowanego (b), oraz HA modyfikowanego PHB (c)

FIG. 1. FT-IR spectra of PHB (a), HA (b) and HA modified by PHB (c)



RYS. 2. Zdjęcia SEM HA modyfikowanego PEG przed zanurzeniem w SBF (a), po 14 dniach (b), po 21 dniach (c) oraz po 28 dniach (d). Wszystkie zdjęcia zostały wykonane w przybliżeniu 4000.

FIG. 2. SEM images of HA modified by PEG before (a) and after soaking in SBF for 14 (b), 21 (c) and 28 (d) days. All pictures were performed at magnification of 4000.

for hydroxyl groups of HA decreased after modification process.

FIG.2 shows the SEM images of HA modified by PEG pellets before (a) and after 14 (b), 21 (c) and 28 (d) days of incubation in SBF. The results show visible changes in surface morphology of pellets. The most significant changes are observed after incubation of pellets in SBF for 21 days. This change may suggest the formation of apatite layer on surface of HA PEG-grafted. These apatite layers can enhance the osteointegration and osteoconductivity. The formation of apatite layer on the surface of pellet goes through a sequence of chemical reactions like spontaneous precipitation, nucleation and growth of calcium phosphate occur when a material is incubated in SBF solution. It has

been suggested that surface chemistry plays an important role in this process and even the functional groups of materials have a large effect on the bone bonding property. The process of HA ongrowth under SBF conditions is regarded as a model of HA ongrowth in human body.

## Conclusions

- The chemical modification of HA and  $\beta$ -TCP surface can be performed with the use of PHB and PEG as modifiers. The presence of groups from modifier on the biomaterials surface is confirmed by the means of FT-IR, ATR and Raman spectroscopy.
- The weight loss of HA modified by PEG and PHB is increased, however in the case of  $\beta$ -TCP the weight loss remained stable after modification.
- The changes on SEM images after incubation in SBF are observed on all biomaterials surface, but the most significant changes are observed on surface of HA modified by PEG and PHB
- Spectra obtained after soaking of materials in tris-HCl and SBF solutions also confirmed the changes on biomaterials surface

*Praca finansowana przez Polskie Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant NN204 137638).*

## Acknowledgments

*This paper was supported by N N204 137638 grant of Poland Ministry of Science and Higher Education, what is gratefully acknowledged.*

## Piśmiennictwo

- [1] B. Świeczko-Żurek, Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2009.
- [2] Praca zbiorowa pod redakcją A. Skręta, Biomateriały, Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów, 2004.
- [3] S. Błażewicz, L. Stoch, Biomateriały tom 4, PAN, 2000.
- [4] A. Zima, Wpływ dodatków modyfikujących na właściwości hydroksyapatytowych wielofunkcyjnych tworzyw implantacyjnych przeznaczonych na nośniki leków, rozprawa doktorska AGH im. S. Staszica w Krakowie, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Kraków 2007.
- [5] J. B. Park, J. D. Bronzino, Biomaterials Principles and Applications, CRC Press, USA, 2002

## References

- [6] D. Buddy Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons, Biomaterials Science, Academic Press, 2000
- [7] T. Kokubo, Bioceramic and their clinical application, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2008.
- [8] J. A. Burdick, R.L. Mauck, Biomaterials and Tissue Engineering Application, Springer-Verlag, Wien, 2011.
- [9] R.B. Heimann, Classic and Advanced Ceramics: From Fundamentals to Applications, Wiley-Vch Verlag, Weinheim, 2010.





# KSZTAŁTOWANIE SUPER-SPRĘŻYSTYCH SPRĘŻYN NiTi DO PLASTYKI CZASZKI

ZDZISŁAW LEKSTON

UNIwersytet Śląski, Instytut Nauki o Materiałach,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLSKA  
MAILTO: ZDZISLAW.LEKSTON@US.EDU.PL

## Streszczenie

W pracy pokazano sposób przygotowania sprężyn NiTi w postaci prostych drutów, które po zamocowaniu w kształcie łuków na sklepieniu czaszki, w czasie leczenia kraniostenoz u dzieci działają ze stałą siłą w pożądanym zakresie odkształceń. Druty wykazujące supersprężystość uzyskano po przeciąganiu lub walcowaniu na zimno i wyżarzaniu w zakresie temperatur 400-500°C. Własności supersprężyste drutów sprawdzono w próbach rozciągania i trójpunktowego zginania. Z najlepszych drutów supersprężystych wykonano, prototypowe sprężynki do badań klinicznych i dobrano optymalne warunki kształtowania ich własności. Zarejestrowane w próbach trójpunktowego zginania krzywe zależności siły w funkcji ugięcia wykazują pożądaną platformę podczas odciażania. Wykonane sprężyny podczas odciażania w pożądanym zakresie odkształceń 20-30 mm działają ze stałą siłą. Przygotowano typoszeregi sprężyn o różnych siłach oddziaływania w zakresie od kilku do około 10 N.

**Słowa kluczowe:** druty NiTi, supersprężystość, obróbka termomechaniczna, plastyka czaszki  
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 33-36]

## Wprowadzenie

W leczeniu kraniostenoz u dzieci stosowaną od lat tzw. „pi plastykę” zmodyfikowano wprowadzając dynamiczną dystrakcję stalowymi sprężynkami w kształcieagrafiek zakładanymi na sklepieniu czaszki w odpowiednich miejscach, wspomagającymi dystrakcję w pożądanym kierunku [1,2]. Zastosowane sprężynki do modelowania prawidłowego kształtu czaszki działały z siłą około 7-15N [3]. W ostatnich latach podjęto próby zastosowania w plastyce czaszki supersprężystych dystraktorów NiTi, które w odróżnieniu od sprężyn stalowych podczas rozprężania działają stałą siłą w wymaganym zakresie odkształceń [4,5]. Do korekcji łódkowatego kształtu czaszki opracowano sprężyny w kształcie spawanych laserowo pierścieni, których własności supersprężyste indukowane są w procesie starzenia pod naprężeniem [6-8]. W korekcji innych wad czaszki potrzebne są również sprężynki zakładane na czaszce w kształcie łuków.

W tej pracy przedstawiono sposób przygotowania sprężyn NiTi do dystrakcji czaszki oraz wybrane wyniki badań uzyskane podczas optymalizacji ich własności.

## Materiały i metody

W badaniach wykorzystano druty NiTi firm Smatec i Euroflex ze stopów Ti-50,8 % at. Ni oraz druty własne ze stopów o tym samym składzie chemicznym o różnych średnicach w zakresie od 1 do 1,3 mm. Druty po przeciąganiu lub walcowaniu na zimno wyżarzano w zakresie temperatur 400, 450 i 500°C w czasie 30 minut. Własności mechaniczne drutów

# FORMING OF SUPERELASTIC NiTi SPRINGS FOR CRANIOPLASTY

ZDZISŁAW LEKSTON

UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
12 BANKOWA STR., 40-007 KATOWICE, POLAND  
MAILTO: ZDZISLAW.LEKSTON@US.EDU.PL

## Abstract

The study shows how to prepare the NiTi springs in the form of straight wires which when attached in the shape of arcs to the vault of the skull operate with a constant force in the desired range of deformations during treatment of craniostenosis in children. Wires with superelastic properties were obtained after drawing or cold rolling and annealing in the temperature range of 400-500°C. Superelastic properties of the wires were tested in the tensile and three-point bending tests. The best superelastic wire was used to manufacture the prototype springs for clinical tests. Optimal conditions for developing their properties were selected. Force curves as a function of deflection registered during three-point bending tests show the desired plateau during unloading. During unloading in the desired range of deformations, i.e. 20-30 mm, the manufactured springs operate with a constant force. Series of types of springs with different interaction forces ranging from several to about 10 N were prepared.

**Key words:** NiTi wires, supersprężystość, thermo-mechanical treatment, cranioplasty

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 33-36]

## Introduction

During years of treatment of craniostenosis in children the so called “pi plasty” was modified by the introduction of a dynamic distraction with steel springs in the shape of safety pins attached to the vault of the skull, where appropriate, to assist the distraction in the desired directions [1,2]. Springs that were used to model the correct shape of the skull operated with a force of about 7-15N [3]. In recent years attempts have been made to apply superelastic NiTi distractors in cranioplasty, which, unlike steel springs, during expansion operate with a constant force in the desired range of deformations [4,5]. To correct the boat-shaped skull the springs in the shape of laser-welded rings, the superelastic properties of which are induced in the process of stress aging, were developed [6-8]. To correct other defects of the skull what is also needed are arc springs which are fixed on the skull.

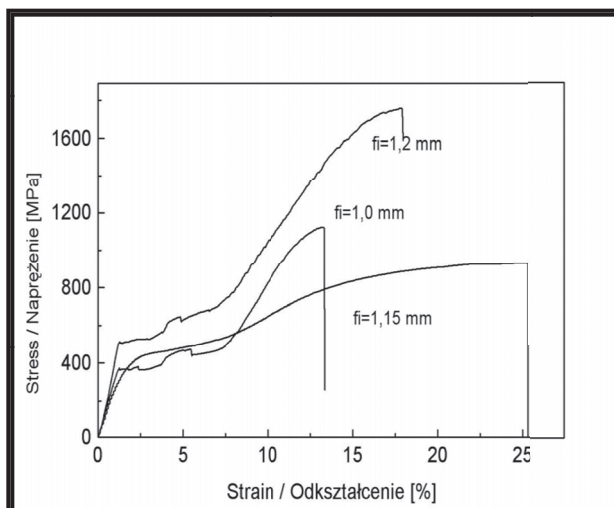
This paper presents the method for the preparation of NiTi springs for the cranial distraction and selected test results obtained during the optimization of their properties.

## Materials and methods

The NiTi wires by Smatec and Euroflex made of Ti-50, 8% at. Ni alloy and our own wires made of the alloys with the same chemical composition and different diameters ranging from 1 to 1.3 mm in the tests were used. The wire after drawing or cold rolling was annealed at the temperatures of 400, 450 and 500° C for 30 minutes. Its mechanical properties were tested during tensile tests on the Instron 4469 test machine. Superelastic properties of the wire after cold deformation and annealing were recorded during three-point

badano w próbach rozciągania na maszynie wytrzymałościowej Instron 4469. Własności supersprężyste drutów po deformacji na zimno i wyżarzaniu rejestrowano podczas trójpunktowego, cyklicznego zginania na mini maszynie wytrzymałościowej TM 2. Na tym samym stanowisku pomiarowym wyposażonym w odpowiednie uchwyty do mocowania próbek mierzono siły podczas cyklicznego uginania sprężynek dystrykcyjnych do kształtu łuków i ich wyprostowywania się podczas odciążania.

## Wyniki i dyskusja



**RYS. 1. Krzywe rozciągania drutów NiTi użytych do przygotowania dystryktorów.**  
**FIG. 1. NiTi wire stress-strain curves used for the manufacture of distractors.**

Badania własności mechanicznych drutów NiTi przeznaczonych na dystryktory czaszkowe przeprowadzono w próbach rozciągania. Przykładowe krzywe zrywania drutów pokazano na RYS. 1. Na krzywych zarejestrowanych w temperaturze pokojowej widoczny jest zakres sprężystego odkształcania w stanie fazy macierzystej B2, plateau podczas przemiany martenzytycznej zaindukowanej naprężeniami a następnie sprężyste i plastyczne odkształcanie w stanie martenzytycznym B19', aż do zerwania próbek. Krzywe „naprężenie-odkształcenie” drutów o średnicach 1,2 mm i 1,0 mm zarejestrowane podczas rozciągania do 8% i odciążania pokazano na RYSUNKU 2. Charakterystyczne pętle wskazują, że materiał ma własności supersprężyste.

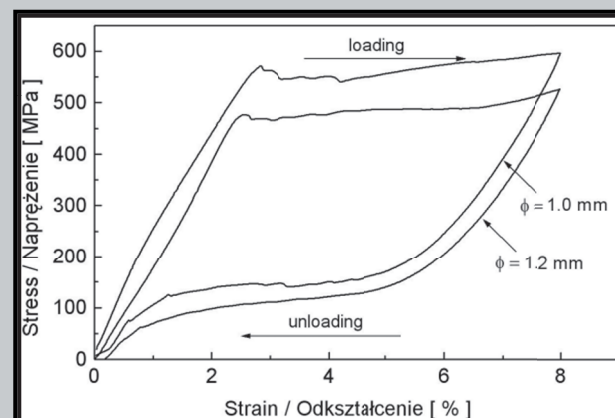
Podobne krzywe wykazujące plateau przy naprężaniu i odciążaniu zarejestrowano podczas trójpunktowego zginania drutów na mini maszynie wytrzymałościowej TM 2. (RYS. 3). Obok pokazano porównanie krzywych zginania drutu Euroflex o średnicy 1,2 mm w stanie dostarczenia oraz drutu własnego po przeciągnięciu na zimno i wyżarzaniu w temperaturze 500°C w czasie 30 minut. Obydwa druty wykazują bardzo dobre własności supersprężyste i pożądaną plateau sił przy odciążaniu (RYS. 4).

Z prostych drutów o najlepszych własnościach supersprężystych wykonano sprężynki do korekty kształtu czaszki zakończone oczkowymi podgięciami umożliwiającymi umocowanie ich na czaszce (RYS. 5). Dystryktory, przymocowane do kości czaszki w kształcie napiętych łuków, pokazano na fotografii wykonanej podczas operacji (RYS.6). Dystryktory zginano w specjalnych uchwytach mini maszyny wytrzymałościowej TM 2 (RYS. 7a,b). Wykonywano jeden lub kilka cykli odkształcania. Przykładowe krzywe zmian sił w za-

cyclic bending testing on the TM2 mini test machine. The same measuring stand equipped with suitable holders for fixing the samples was used to test the force during cyclic bending of the distractor springs to the shape of arcs and their straightening during unloading.

## Results and discussion

Mechanical properties of NiTi wire intended for cranial distractors were checked during tensile tests. Sample curves of tensile tests of wires are shown in FIG.1. The curves recorded at room temperature show a range of elastic deformation in the B2 parent phase, plateau during martensitic transformation induced by stress and then elastic and plastic deformation in the B19' martensitic state, until the samples are broken. Loading-unloading curves of the wires with different diameters up to the deformation of 8% are shown in FIG.2. The recorded curves shows that the wires have superelastic properties.



**RYS. 2. Pętle supersprężystości zarejestrowane podczas cyklicznego rozciągania drutu NiTi.**  
**FIG. 2. Superelastic loops recorded during loading-unloading of the NiTi wire.**

Similar curves showing plateau during loading and unloading were recorded during the three-point bending of the wire on the TM2 mini testing machine (FIG. 3). Next to it there is a comparison of the Euroflex wire bending curves with the diameter of 1.2 mm in the state of delivery and our own wire after cold drawing and annealing at the temperature of 500°C for 30 min. Both types of wire exhibit very good superelastic properties and the desired plateau of the forces during unloading (FIG.4).

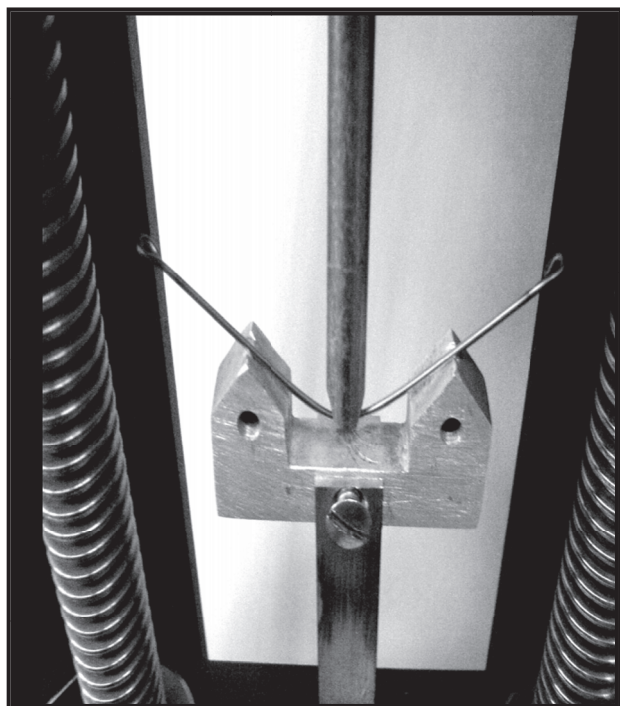
Straight wire with the best superelastic properties was used to make springs for the correction of the shape of the skull. They have eye bends which facilitate their being fixed on the skull (FIG.5). Distractors, attached to the bones of the skull and in the shape of tight curves, are shown in the photograph taken during a surgery (FIG. 6).

Distractors were deflected in special handgrips of the TM2 mini testing machine (FIG.7a, b). One or more cycles of deformation were performed. As for the distractor which is 70 mm in length and is made of wire with the diameter of 1.2 mm examples of the force change curves depending on the degree of deflection from the upright state to the shape of the letter U are shown in FIG.7b.

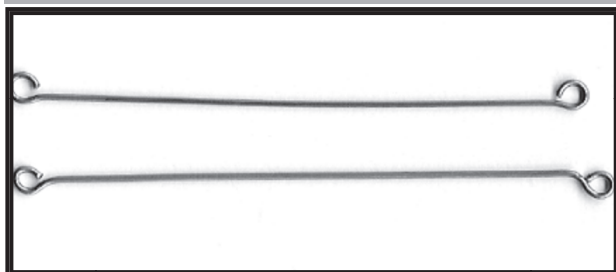
## Summary

It was found that the distractors prepared in this way, i.e. in the shape of the letter U are fixed on the skull oper-





**RYS. 3.** Ugięty dystraktor NiTi podczas prób zginania na mini maszynie TM 2.  
**FIG. 3.** Deflected NiTi distractor during bending tests on the TM2 mini test machine.

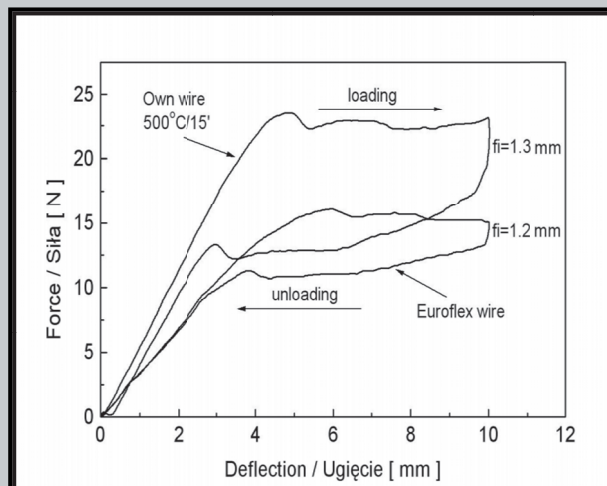


**RYS. 5.** Kształt dystraktorów NiTi przed implantacją.  
**FIG. 5.** The shape of NiTi distractors before implantation.

leżności od stopnia ugięcia, od stanu wyprostowanego do kształtu litery U, dla dystraktora o długości  $L = 70$  mm wykonanego z drutu o średnicy 1,2 mm pokazano na RYS. 7c.

## Podsumowanie

Stwierdzono, że tak przygotowane dystraktory po umocowaniu ich w kształcie litery U na czaszce działają stałą siłą podczas dystrakcji w pożądanym, szerokim zakresie odkształceń nawet do 30 mm. Siły działania dystraktorów zależą od ich średnicy i długości i mieszczą się w zakresie od kilku do 10 N. Badania kliniczne zastosowania opracowanych, supersprężystych dystraktorów NiTi w leczeniu wad czaszkowych u dzieci rozpoczęte w 2000 roku w Szpitalu Chirurgii Plastycznej w Polanicy są kontynuowane. Początkowo dystraktory łukowe przykręcano do kości czaszki wkrętami tytanowymi. W obawie przed osteolizą i obłuzowaniem wkrętów

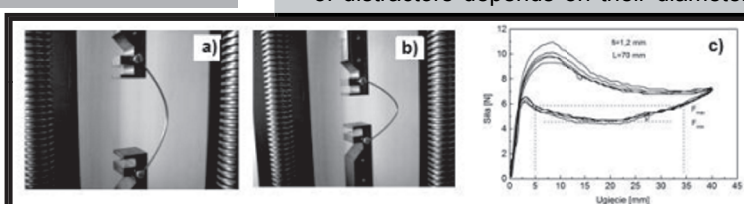


**RYS. 4.** Zmiany sił zarejestrowane podczas trójpunktowego zginania drutów NiTi.  
**FIG. 4.** Force changes recorded during three-point bending of the NiTi wire.



**RYS. 6.** Dystraktory NiTi wygięte do kształtu łuków i przymocowane do czaszki nicią chirurgiczną.  
**FIG. 6.** NiTi distractors deflected to the shape of the arcs and fixed to the skull with surgical sutures.

ate with a constant force during distraction in the desired and wide range of distractions, even up to 30 mm. Forces of distractors depends on their diameter and length, and



**RYS. 7.** Dystraktor NiTi zginany podczas pomiarów sił przy użyciu mini maszyny TM2 (a, b) i krzywe zmian sił zarejestrowane podczas cyklicznego naprężania i odciążania dystraktora (c).  
**FIG. 7.** NiTi distractor deflected during the measurement of the force with the use of the TM2 mini testing machine (a, b) and force change curves recorded during cyclic stretching and unloading of the distractor (c).

are being continued. Initially, arc distractors were screwed to the skull with titanium screws. In fear of osteolysis and loosening of the screws, surgical sutures were used in subsequent operations. When the interaction forces need to be increased, two or more distractors can be fixed in the places that require correction.



w następnych operacjach zastosowano mocowanie nicią chirurgiczną. W przypadku konieczności zwiększenia sił oddziaływań można założyć dwa lub więcej dystraktorów w odpowiednich miejscach wymagających korekcji.

## Podziękowanie

*Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego Nr N N507 296339*

## Acknowledgement

*This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, project no N N507 296339.*

## Piśmiennictwo

- [1] C. Lauritzen, Y. Sugawara, O. Kocabalkan, R. Olsson., Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg. 32 (1998) 331.
- [2] C. Lauritzen, P. Tarnow., Scandinavian Journal of Surgery 92 (2003) 274.
- [3] L. David, P. Proffer, W. Hurst, S. Glazier, L. Argenta., J. Craniofac. Surg. 15 (5) (2004) 810.
- [4] Z. Lekston, H. Morawiec, J. Drugacz., Mater. Sci. Eng. A 378 (2004) 537.

## References

- [5] K.Kobus, M.Węgrzyn, Z.Lekston, H.Morawiec, J. Drugacz., J. Craniofacial Surgery 18 (3) (2007) 504.
- [6] H. Morawiec, Z. Lekston, K. Kobus, M. Węgrzyn, J. Drugacz., J. Mater. Sci: Mater Med. 18 (2007) 1791.
- [7] H. Morawiec, Z. Lekston, K. Kobus, M. Węgrzyn, J. Drugacz., J. Mater. Engineering and Performance 18 (2009) 818.
- [8] H. Morawiec, Z. Lekston, K. Kobus, M. Węgrzyn, J. Drugacz., Patent RP Nr 211401 (2006).



# OCENA WPŁYWU PROMIENIOWANIA UV NA KOLAGEN RYBI METODAMI SPEKTROSKOPOWYMI

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

UNIwersytet Mikołaja Kopernika,  
Wydział Chemii, Zespół Biopolimerów,  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń, Polska  
MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 37-38]

## Wstęp

Kolagen, najbardziej rozpowszechniony biopolimer w organizmie człowieka, jest uważany za jeden z najbardziej użytecznych biomateriałów naturalnych. Białko to jest łatwo dostępne, nietoksyczne, dlatego stanowi doskonałą bazę dla biomateriałów [1,2]. Kolagen rybi może być cennym i bezpiecznym substytutem kolagenu wołowego i wieprzowego do zastosowań biomedycznych i farmaceutycznych. Kolagen rybi charakteryzuje się niskim ryzykiem zakażenia chorobotwórczymi patogenami, takimi jak gąbczasta encefalopatia bydła (BSE) [3]. Właściwości fizyczne biomateriałów na bazie kolagenu, jak również szybkość ich resorpcji, czy też degradacji można poprawić poprzez sieciowanie. Powstawanie wiązań sieciujących można osiągnąć stosując zarówno chemiczne, jak i fizyczne czynniki sieciujące. Jednym z fizycznych czynników sieciujących jest promieniowanie UV. Promieniowanie UV stosuje się też w celach modyfikacji właściwości powierzchniowych, jak również do sterylizacji biomateriałów [4].

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu promieniowania UV na kolagen wyizolowany z łusek ryb. Kolagen został poddany działaniu promieniowania UV. Zachodzące zmiany zanalizowano metodami spektroskopii UV-VIS oraz FTIR.

## Materiały i metodyka

Kolagen wyizolowano z łusek rybich (*Esox Lucius*), poprzez demineralizację oraz rozpuszczenie w kwasie octowym [5]. Filmy kolagenowe uzyskano metodą odparowania rozpuszczalnika. Filmy suszono w powietrzu, w temperaturze pokojowej.

Filmy poddano działaniu promieniowania UV. Źródłem promieniowania UV była niskociśnieniowa lampa rtęciowa TUV 30 W (Philips, Holandia), emitująca głównie promieniowanie  $\lambda=254$  nm o natężeniu  $0,263 \text{ J/cm}^2\text{min}$ .

Widma filmów kolagenowych zarejestrowano na spektrofotometrze Genesis II FTIRTM firmy Mattson. Pomiarów dokonywano bezpośrednio po naświetlaniu próbek, w temperaturze pokojowej i w atmosferze powietrza.

Roztwór kolagenu umieszczony w kwarcowej kuwecie poddano działaniu

# SPECTROSCOPIC STUDIES INTO THE INFLUENCE OF UV RADIATION ON FISH COLLAGEN

JUSTYNA KOZŁOWSKA, ALINA SIONKOWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,  
FACULTY OF CHEMISTRY, GROUP OF BIOPOLYMERS,  
7 GAGARINA STR., 87-100 TORUŃ, POLAND  
MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 37-38]

## Introduction

Collagen, the most prevalent structural biopolymer in the human body, is regarded as one of the most useful natural biomaterials. Collagen is readily available, non-toxic and provides an excellent basis for biomaterials [1,2]. Fish collagen can be a useful and safe substitute for bovine and pig collagens for biomedical and pharmaceutical applications. Fish collagen should have a relatively low risk of possessing unknown pathogens such as bovine spongiform encephalopathy (BSE) [3]. The crosslinking process improves the physical properties of collagen-based biomaterials as well as their resorption/degradation rate. Synthetic crosslinks can be achieved using either chemical crosslinking agents or physical crosslinking methods. Physical crosslinking can be achieved by UV irradiation. UV radiation is widely used in biomaterials science for surface modification and sterilization [4].

The aim of this work was to study the influence of UV irradiation on collagen extracted from fish scales. Collagen solutions and/or films were irradiated and the UV-Vis absorption and FTIR spectra were recorded.

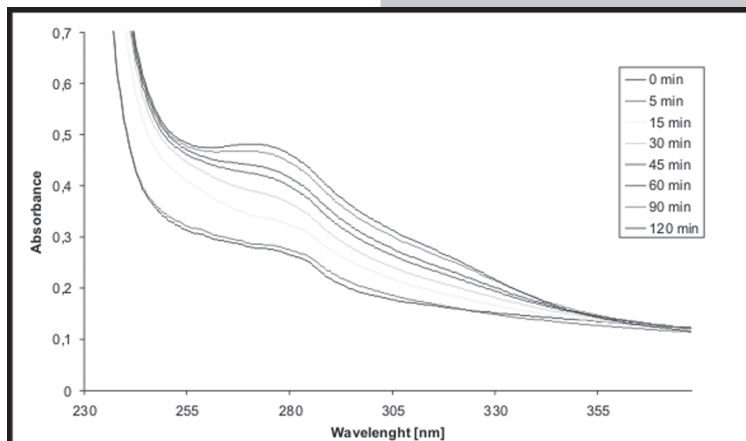
## Materials and methods

Collagen was extracted from fish scale (*Esox Lucius*), a calcified tissue, through demineralization following acetic acid treatment [5]. Collagen films were prepared by solution casting onto glass plates. After solvent evaporation, the samples were dried in vacuum at room temperature.

Air-dried collagen films were submitted to treatment with UV irradiation for different time intervals, in air at room temperature using a mercury lamp, Philips TUV-30, which emits light of mainly 254 nm wavelength. The intensity of radiation was  $0.263 \text{ J/cm}^2\text{min}$ .

The IR spectra of films were obtained using a Mattson Genesis II spectrophotometer. All spectra were recorded in absorption mode at  $4 \text{ cm}^{-1}$  intervals and 16 scans.

Irradiation experiments were carried out in a quartz cuvette at a distance of 3 cm from the light source. The UV-Vis absorption spectra of collagen, before and immediately after UV irradiation were recorded with a Shimadzu spectrophotometer (Model UV-1601PC). All meas-



RYS. 1. Widma UV-VIS kolagenu rybiego przed i po naświetlaniu.  
FIG. 1. UV-VIS spectra of fish collagen before and after UV irradiation.

niem promieniowania UV, w odległości 3 cm od źródła światła. Widma UV-VIS przed i bezpośrednio po napromienianiu UV zostały zarejestrowane za pomocą spektrofotometru Shimadzu (Model UV-1601PC). Wszystkie pomiary zostały wykonane w tych samych warunkach temperatury i wilgotności.

## Wyniki i dyskusja

Widma absorpcyjne w zakresie widzialnym i nadfioletowym roztworu kolagenu po różnych czasach naświetlania przedstawiono na RYS.1.

W wyniku napromieniania roztworu kolagenu następuje wzrost absorbancji w maksimum absorpcji przy 278 nm. Obserwowane zmiany spowodowane są zmianami konformacyjnymi kolagenu oraz przemianami aminokwasów aromatycznych.

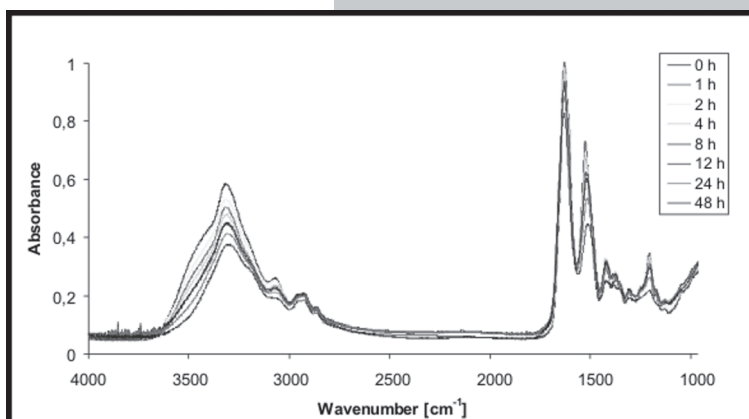
Widma FTIR kolagenu rybiego przedstawiono na RYS.2. Jak widać z RYSUNKU 2 pasma amidowe uległy przesunięciu pod wpływem promieniowania UV. W szczególności położenie pasma amidowego A uległo wyraźnemu przesunięciu w kierunku niższych częstości (TABELA 1). Świadczy to o zmianach konformacyjnych w cząsteczce kolagenu oraz ubytku wody z nim związanej. Po ekspozycji na promieniowanie UV zaobserwowano zmniejszenie pól powierzchni pasm amidowych (TABELA 2), co wskazuje na zachodzącą fotodegradację kolagenu.

## Wnioski

Materiały na bazie kolagenu rybiego mogą być sterylizowane i modyfikowane promieniowaniem UV. Jednak, w wyniku działania tego promieniowania, następuje rozrywanie wiązań wodorowych stabilizujących strukturę potrójnej helisy, co prowadzi do zmian konformacji i przejścia cząsteczek kolagenu ze struktury helikalnej w strukturę kłębką statystycznego. Fotodegradacja kolagenu wynika z rozrywania wiązań peptydowych, a także z powstawania nowych produktów przemian fenylalaniny i tyrozyny.

## Piśmiennictwo

- [1] S.N. Lakshmi, T.L. Cato. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007;32:762-798.
- [2] C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;221:1-22.
- [3] M. Zhang, W. Liu, G. Li. Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry* 2009;115:826-831.



RYS. 2. Widma FTIR kolagenu rybiego przed i po napromienianiu UV.

FIG. 2. FTIR spectra of fish collagen before and after UV- irradiation.

TABELA 1. Położenie pasm amidowych w widmie kolagenu po różnych czasach naświetlania UV.

TABLE 1. Amide band position for collagen before and after UV- irradiation.

P a s m o amidowe Band	Położenie pasm przed i po naświetlaniu UV [cm⁻¹] Position of the band [cm⁻¹] after UV- irradiation							
	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
A	3324	3320	3319	3318	3315	3314	3311	3305
B	3081	3082	3081	3079	3078	3078	3078	3078
I	1658	1658	1658	1658	1659	1658	1658	1658
II	1554	1552	1554	1550	1547	1545	1540	1540

TABELA 2. Pola powierzchni pasm amidowych w widmie kolagenu po różnych czasach naświetlania.

TABLE 2. Amide bands integral intensity for collagen before and after UV- irradiation.

P a s m o amidowe Band	Pola powierzchni pasm przed i po naświetlaniu UV [cm⁻¹] The area of band after UV- irradiation							
	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
A + B	138	129	118	98,1	89,1	88,4	77,6	69,3
I	43,8	42,8	42,4	41,2	40,3	39,9	38,4	37,5
II	21,6	21,2	21,1	19,9	19,2	17,9	15,0	10,7

urements were performed in the same conditions of temperature and humidity.

## Results and discussion

UV-VIS spectra of collagen are presented in FIG.1.

After UV irradiation of fish collagen we observed an increase of absorbance at 278 nm due to the conformational alterations of collagen and to photochemical reactions of aromatic amino acids responsible for this absorption. FTIR spectra of collagen are shown in FIG.2.

We observed shift of the position of the amide bands. Especially the amide band A has been shifted to lower frequencies (TABLE 1). This fact suggest the conformational alterations of collagen molecule and the loss of water bonded to collagen. The drop of integral intensity of all amide bands in collagen during UV irradiation was observed (TABLE 2). It is an evidence of degradation of collagen by UV-irradiation.

## Conclusions

Fish collagen-based materials can be sterilized and

modified by UV-irradiation. However, UV radiation induces destruction of the hydrogen bonds, which are formed between the helix of collagen molecule and leads to partial destruction of the triple helix structure of collagen molecule to the random coil structure. Photodegradation of fish collagen results in the scission of peptide linkage and formation of new photoproducts from tyrosine and phenylalanine.

## References

- [4] R. Parentau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials* 2010;3:1863-1887.
- [5] J. Kozłowska, A. Sionkowska. Isolation and characterization of collagen from fish (*Esox Lucius*) scale". *Engineering of Biomaterials/Inżynieria biomateriałów* 2011;14:24-26.



# POWŁOKI PARYLENOWE DO OCHRONY POWIERZCHNI METALOWYCH IMPLANTÓW

M.CIEŚLIK<sup>1\*</sup>, M.GOŁDA<sup>2</sup>, A.KOTARBA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LFC SP. Z O.O., UL. SKŁADOWA 5B,  
66-016 CZERWIŃSK, POLSKA

<sup>2</sup> UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, WYDZIAŁ CHEMII,  
INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLSKA

\*MAILTO: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 39-41]

## Wstęp

Austenityczna stal nierdzewna (SS) jest materiałem najczęściej stosowanym do implantowania w organizmie ludzkim. Ze względu na swoje własności chemiczne i mechaniczne, zdolność do nadawania kształtów oraz relatywnie niską cenę materiał ten stosowany jest głównie do produkcji śrub, wkrętów, płytek stabilizujących, gwoździ śródszpikowych oraz do wytwarzania narzędzi chirurgicznych [1]. Stal nierdzewna posiada jednak również kilka wad, z których najpoważniejszą jest możliwość wystąpienia korozji na powierzchni. Obserwowane procesy korozyjne związane są z procesem uwalniania toksycznych jonów metali (żelazo, chrom i nikiel), a w konsekwencji tego niszczeniem implantu. Może to powodować wszelkiego rodzaju odczyn zapalny oraz alergię. Dlatego też, w celu zminimalizowania procesu uwalniania jonów należy zastosować odpowiedni sposób modyfikacji powierzchni materiałów implantacyjnych [2]. Obecne strategie badawcze skoncentrowane są na zastosowaniu ochronnych powłok polimerowych. Jednym z rodzajów polimerów, który obecnie znalazł zainteresowanie jest parylen C. Polimer ten wykazuje wysoką biokompatybilność i możliwość wytworzenia cienkiej, ciągłej i inertej powłoki [3]. Często też, w celu polepszenia adhezji powłoki ochronnej do podłoża metalowego stosuje się cienką warstwę kleju adhezyjnego (silan A174). Większość badań nad powłokami polimerowymi ma na celu zwiększenie odporności korozyjnej powierzchni metalowych implantów poprzez ograniczenie procesu uwalniania jonów metali. Inną ważną cechą powłok na implantach jest odporność na zarysowanie czy zużycie ściernie. W celu monitorowania procesów zachodzących na powierzchni implantów metalowych w środowisku biologicznym wykorzystywane są testy in vitro, zaś właściwości mechaniczne powłok są badane przy użyciu testów zużyciowych.

Celem przeprowadzonych badań była analiza właściwości ochronnych polimerowej powłoki silanowo+parylenowej C, osadzonej na powierzchni stali implantacyjnej 316L, z punktu widzenia właściwości anykorozyjnych i mechanicznych.

## Materiały i metodyka badań

Próbki stali nierdzewnej 316L były przemyte, wytrawione oraz pokryte 8 µm powłoką parylenu C przy użyciu metody osadzania z fazy gazowej (CVD) (ParaTech) opisanej w [3]. Przed pokryciem próbek stali parylenem, została nałożona cienka warstwa silanu A 174 za pomocą metody zanurzeniowej. Próbki stali bez powłok wykorzystywane były jako próbki referencyjne. Wszystkie próbki analizowano pod kątem właściwości ochronnych. Testy uwalniania jonów in vitro wykonane były przez różne okresy czasu (1 dzień - 28

# PARYLENE COATING FOR METAL IMPLANT SURFACE PROTECTION

39  
.....

M.CIEŚLIK<sup>1\*</sup>, M.GOŁDA<sup>2</sup>, A.KOTARBA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LFC SP. Z O.O., UL. SKŁADOWA 5B,  
66-016 CZERWIŃSK, POLAND,

<sup>2</sup> JAGIELLONIAN UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY,  
3 INGARDENA STR., 30-060 KRAKOW, POLAND,

\*MAILTO: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 39-41]

## Introduction

Austenitic stainless steel (SS) is one of the most commonly used orthopedic implant material. Because of its mechanical strength, the capability to bend and shape as well as relatively low cost, it is used for production of the screws, nails, plates and instrumentation [1]. However, SS has some significant disadvantages; the most common is surface corrosion. Observed corrosion is related to the toxic metal ions release (iron, nickel and chromium) and as a consequence, implant damage is observed. This in turn may result in allergy and dangerous diseases. For that reason, appropriate surface engineering of the metal implant is of critical importance when attempting to limit the metal ions release [2]. Nowadays, strategies of investigation are focused on application of protective polymer coatings. Nowadays, one of the polymers that draw the attention is parylene C. This polymer exhibits excellent biocompatibility and possibility to form continuous, thin layer [3]. However, pre-treatment with the organic silane A174 as an adhesion promoter of parylene coating is the recommended preparation of steel surface. Most investigations on coatings used for medical devices aim to increase the corrosion resistance while decreasing the release of metal ions into the body. Another important characteristic of the coatings on metal implants involves its mechanical properties, such as friction and wear resistance. For monitoring the processes taking place on metal implant surfaces in biological environments the in vitro tests and wear tests are often used.

The aim of the present study was to evaluate protective function of silane+parylene C coating on SS (316L) in terms of mechanical and anticorrosion properties.

## Experimental

Samples of SS 316L grade were cleaned, pickled and coated with an 8 µm of parylene C by means of Chemical Vapour Deposition (CVD) (ParaTech) described in elsewhere [3]. Prior to covering with parylene, the SS samples were coated by adhesive glue, silane A174, via a dipping method. Cleaned uncoated SS samples were used as references. All analyzed samples were investigated for protective properties. In vitro metal ion release tests were performed for different period of time (1 day - 28 days) in darkness, using a shaking incubator at a temperature of 37°C. All exposure tests were performed in Hanks solution, which is an artificial salts mixture (pH=7.4) with hydrogen peroxide addition. Samples of the solution after the exposure period were analyzed for the concentrations of the released metals (Fe, Cr, Ni) by Atomic Absorption Spectrometer Perkin-Elmer Model 3110. Young modulus measurements and scratch test were performed with the use of MicroCombi Tester (CSM). For scratch test a Rockwell C spherical diamond stylus with cone apex angle of 120° and tip radius of 200 µm was used. Based on the obtained results, the static coefficient

dni) w inkubatorze z wytrząsaniem, w temperaturze 37°C. Jako sztuczny płyn fizjologiczny wykorzystano płyn Hanksa, który jest mieszaniną sztucznych soli fizjologicznych (pH=7.4). Próbki płynów po testach były analizowane pod kątem ilości uwolnionych jonów (Fe, Cr, Ni) z wykorzystaniem spektrometru absorpcji atomowej Perkin-Elmer Model 3110. Pomiary modułu Younga oraz scratch testy wykonano z wykorzystaniem MicroCombi Tester (CSM). W pomiarach zarysowania wykorzystano diamentowy węglownik Rockwella C o kącie 120° i średnicy zaokrąglenia 200 µm. Na podstawie wyników obliczono statyczny współczynnik tarcia. Badania ścieralności przeprowadzono na triboteście typu kula-tarcza wg norm ASTM G 99-05. Do pomiarów wykorzystano polerowaną kulkę stalową 100Cr6 o średnicy 6 mm. Testy prowadzono przez 5000 cykli, przy prędkości obrotowej 60 obr/min. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono współczynnik tarcia dynamicznego, profil otrzymanej bruzdy oraz wskaźnik zużycia.

## Wyniki i dyskusja

Typowe zdjęcia mikroskopowe (SEM) powierzchni stali implantacyjnej bez i z powłoką silanowo-parylenową C przedstawiono na RYS.1. Wykazują one, że zastosowany układ polimerowy tworzy gładką i jednorodną warstwę ochronną na powierzchni stali nierdzewnej. Na RYS.2 przedstawiono sumaryczne stężenia uwolnionych jonów metali (Fe+Cr+Ni) w zależności od czasu inkubacji w płynie fizjologicznym dla próbek niepokrytych i pokrytych powłoką ochronną. Otrzymane wyniki badań wykazały, że wraz z czasem inkubacji wzrasta stężenie jonów w badanych roztworze. W przypadku próbek niepokrytych, wzrost ten był obserwowany od początku czasu pomiarowego i miał charakter liniowy. Taka zależność liniowa wynika z faktu, że w 37°C nadtlenek wodoru intensywnie reaguje z powierzchnią stali powodując jej wzmożoną korozję. Natomiast dla próbek pokrytych powłoką polimerową stężenie jonów w początkowym etapie testów (14 dni) było nieznaczne. Wraz z upływem czasu inkubacji zaobserwowano eksponencyjny wzrost ich ilości w roztworze. Świadczy to o złożoności procesów występujących podczas procesu uwalniania jonów metali do płynów ustrojowych. Początkowo kinetyka przechodzenia jonów metali związana jest z procesem ich dyfuzji przez warstwę ochronną. Dopiero później obserwuje się zwiększenie ilości jonów w roztworze. Zestawienie badanych właściwości mechanicznych próbek niepokrytych i pokrytych powłoką silanowo-parylenową C przedstawiono w TAB.1.

Wartość modułu Younga dla badanej powłoki była 20-krotnie niższa od wartości dla stali i zbliżona do wartości modułu Younga dla kości (ok.10 GPa). Jest to bardzo korzystne z punktu widzenia aplikacji medycznych. Wartość

of friction was calculated. Wear tests were carried out with a ball on disc tribotester according to ASTM G 99-05. For this kind of measurements polished 100Cr6 steel ball with a diameter of 6 mm was used. Tests were carried out for 5000 cycles at a speed of 60 rev./min. The results show the dynamic friction coefficient, groove profile and wear index.

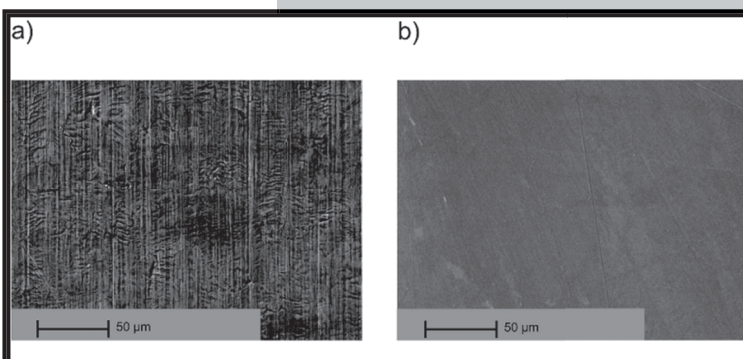
## Results and discussion

The typical SEM pictures for uncoated (reference) and silane-parylene C coated samples are presented in FIG.1. From the microscopic observations it can be inferred that the parylene coating composed a smooth uniform layer at the SS surface. In FIG.2 the kinetic of the total metal ion release (Fe+Cr+Ni) for different kind of analyzed samples are presented. Obtained results clearly show increase of metal ions release rate in body fluid after longer experiment time. In the case of uncoated samples, increase has been observed since the beginning of the experiment time and was linear. Such linear dependence results from the fact that at 37°C. hydrogen peroxide reacts with the steel surface and cause increased corrosion. However, for polymer coated samples

concentration of ions in the initial stage (14 days) was low. Together with the incubation time exponential increase of metal ions in solution was observed. These illustrates the complexity of the processes occurring during the release of metal ions to the body fluids. Initially, the kinetics of metal ions transition are related to the process of diffusion through a protective layer. After longer exposure time increase of metal ions release rate was observed.

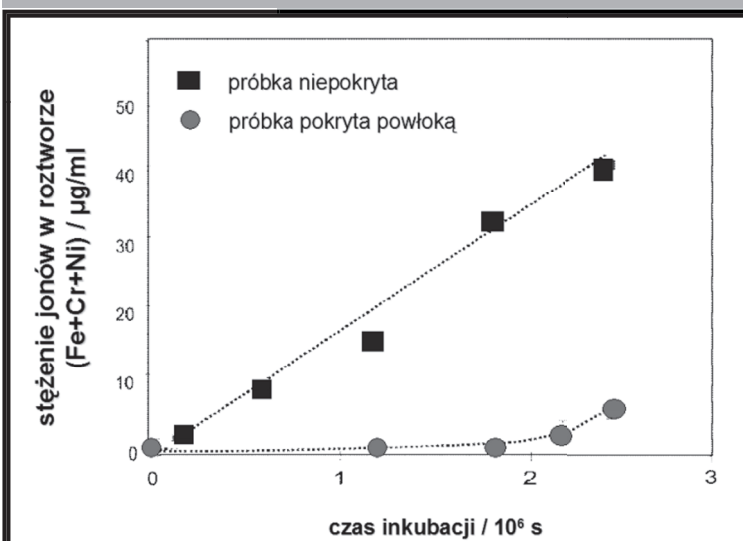
Summary of mechanical properties of the uncoated and silane-parylene C coated samples SS are shown in TAB.1. The value of the Young modulus for analyzed

coating was 20 times lower in compare to Young modulus for steel and it was similar the value obtained for bone (10 GPa). This is very advantageous for medical applications. The value of the static friction coefficient obtained from



RYS. 1. Zdjęcia SEM próbki niepokrytej (a) i pokrytej (b) powłoką ochronną.

FIG. 1. SEM pictures for uncoated (a) and coated (b) samples.



RYS. 2. Zależność stężenia jonów metali od czasu inkubacji dla badanych próbek.

FIG. 2. Total metal ion release after different incubation time for analyzed samples.

**TAB. 1. Zestawienie właściwości mechanicznych badanych próbek.**  
**TAB. 1. Mechanical properties for analyzed samples.**

Rodzaj próbki Sample	Właściwości / Properties				
	Moduł Younga Young Modulus (GPa)	Współczynnik tarcia Friction coefficient	Dynamiczny współczynnik tarcia Dynamic friction coefficient	Profil bruzdy Groove volume ( $\mu\text{m}^2$ )	Wskaźnik zużycia Wear index ( $\text{mm}^2/\text{Nm}$ )
Bez powłoki Uncoated	200	0,25	0,87	37	$37 \cdot 10^{-6}$
Z powłoką silanowo-parylenową C Silane-parylene C coated	7,8	0,20	0,14	22	$2,2 \cdot 10^{-6}$

współczynnika tarcia statycznego otrzymanego ze scratch testów dla badanych próbek stali niepokrytej i pokrytej powłoką ochronną była zbliżona. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku wyznaczania współczynnika tarcia dynamicznego. Para trąca: kula stalowa – próbka niepokryta wykazywała współczynnik tarcia ok. 0.87, co było spowodowane zacieraniem niesmarowanego styku tarcowego. Powłoka silanowo-parylenowa C wykazywała bardzo dobre właściwości ślizgowe w kontakcie ze stalową kulą. Odporność na zużycie wyznaczono na podstawie pomiarów wielkości profili bruzd powstałych w wyniku tarcia kulą badanego podłoża (ball on disc test). Zużycie próbek niepokrytych było głównie wynikiem ścierania. Świadczy o tym wysoka wartość wskaźnika zużycia oraz obecność cząstek stali oderwanych od badanego podłoża. Zużycie próbek pokrytych było wynikiem deformacji powłoki polimerowej i brzdowania jej powierzchni. Wskaźnik zużycia dla tego rodzaju próbki był o ok. 90 % niższy w porównaniu do wartości wskaźnika zużycia dla próbki niepokrytej.

## Wnioski

Pomiary uwalniania jonów metali oraz pomiary właściwości mechanicznych są uzupełniającymi i właściwymi metodami analizy odporności korozyjnej i właściwości ochronnych powłok polimerowych na implantach stalowych. Otrzymane wyniki badań wykazały, że zastosowana powłoka stanowi dobrą barierę ochronną. Testy kinetyki uwalniania jonów metali w sztucznych płynach fizjologicznych wykazały, że silanowo-parylenowa C powłoka polimerowa ogranicza proces korozji stali nierdzewnej. Wyniki testów mechanicznych wykazały, że zastosowana powłoka ochronna zabezpiecza powierzchnię stali przed procesem zużycia ściernego i wytwarzaniem produktów ścierania. Dzięki zastosowaniu powłoki polimerowej została zmniejszona wartość współczynnika tarcia dynamicznego oraz współczynnik zużycia badanej powierzchni.

## Podziękowania

*Podziękowania dla pana dr S. Zimowskiego za przeprowadzenie testów zużyciowych.*

## Piśmiennictwo

- [1] Donglu Shi, Introduction to Biomaterials, Tsinghua University Press, 2006.
- [2] D.P. Le, Y.H. Yoo, J.G. Kim, S.M. Cho, Y.K. Son, Corros. Sci., 51 (2009) 330.

scratch tests for uncoated and coated steel samples were similar. Different situation was determined in the case of dynamic friction coefficient. Pair: steel ball - uncoated sample showed a coefficient of friction of about 0.87, which was caused by friction induced degradation of non-lubricated contact surfaces. Silane-parylene C coating showed very good sliding properties in contact with a steel ball. Wear resistance was determined by measuring the size of grooves profiles obtained from wear test (ball on disc test). Damage of uncoated samples was mainly due to abrasion as it was proved with the high wear index and the presence of wear particles from the tested substrate. The damage of the coated samples was due to deformation of the polymer coating and plugging surface. Wear index for this type of sample was about 90% lower compared to the values of the wear index for the uncoated sample.

## Conclusions

Metal ions release tests and mechanical tests are suitable and complementary methods for investigations of the corrosion resistance and protective properties of the polymeric coating on SS implant surface. Long-term exposure tests in simulated body fluid revealed that the parylene C coating can be successfully used for corrosion protection of stainless steel 316L. Obtained results indicated that tested coating reduced steel surface corrosion. Results from mechanical tests show that analyzed polymer coating protects steel surface against wear damage and production of the wear debris. Application of coating on steel surface reduced dynamic friction coefficient and wear index.

## Acknowledgements

*Acknowledgements to PhD S. Zimowski for wear tests.*

## References

- [3] M. Cieřlik, K. Engvall, J. Pan, A. Kotarba, Corros. Sci., 53 (2011) 296.



## CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI UŻYTKOWYCH STOPU MAGNEZU Z POWŁOKĄ HYDROKSYAPATYTOWĄ

AGATA DUDEK<sup>1\*</sup>, MARCIN A. MALIK<sup>2</sup>

POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ MATERIAŁOWEJ I FIZYKI STOSOWANEJ,

<sup>1</sup>INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,

<sup>2</sup>KATEDRA CHEMII AL. ARMII KRAJOWEJ

19, 42 – 200 CZĘSTOCHOWA

\*MAILTO: DUDEK@WIP.PCZ.PL

### Streszczenie

*Zainteresowanie biomateriałami, związane z możliwością zastosowania ich na implanty, wywołuje z jednej strony nieustanny wzrost wymagań stawiany tego typu materiałom, z drugiej natomiast, poszukiwanie nowych metod i technologii poprawiających ich własności użytkowe [1-2].*

*W ciągu ostatnich 10 lat, znacznie wzrosło zastosowanie magnezu i jego stopów, szczególnie w zastosowaniach medycznych. Zjawisko to związane jest głównie z bardzo korzystnymi własnościami tych materiałów takich jak: niska gęstość czy wysokie własności wytrzymałościowe. Zainteresowanie stopami magnezu, jako biomateriału skupia się głównie na zastosowaniach implantologicznych. Związane jest to głównie z tym, że materiał ten jest biokompatybilny i bioresorbowalny. Ponadto, jego właściwości mechaniczne są bliskie naturalnej kości w porównaniu z innymi metalami wykorzystywanymi, jako biomateriały na implanty (np. stopy Ti i Co-Cr) [1-4].*

*Magnez i jego stopy są materiałami biodegradowalnymi w ludzkich płynach organicznych, jednocześnie ich słaba odporność na korozję może doprowadzić do nagłej awarii implantów.*

*W ramach niniejszej pracy stop magnezu (AZ91) pokryto metodą metalurgii proszków powłoką hydroksyapatytu w celu poprawy jego biodegradacji.*

*Priorytetowym celem proponowanych w ramach niniejszej pracy badań była analiza własności wytrzymałościowych na granicy powłoka-podłoże. Własności te zostały określone przy pomocy testu, polegającego na zarysowaniu (Scratch Test) powłoki ceramicznej. Określono ponadto skład fazowy powstałych powłok.*

**[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 42-45]**

### Wstęp

Stopy magnezu w ostatnim czasie przyciągają dużą uwagę, jako potencjalny materiał biodegradowalny na implanty kostne ze względu na ich biodegradację i brak toksycznego wpływu na organizm ludzki. Jednakże, konieczna jest obróbka powierzchni tych materiałów w celu ich ochrony przed korozją, ponieważ Mg jest metalem o znacznej aktywności w ludzkich płynach ustrojowych oraz osoczu krwi. Jednym ze sposobów poprawy wspomnianych własności jest nanoszenie na powierzchnię stopów magnezu powłok ceramicznych [1-4].

Zainteresowanie powłokami hydroksyapatytowymi na przestrzeni ostatnich lat w zastosowaniach medycznych znacznie wzrosło. Hydroksyapatyt w medycynie (HA,

## CHARACTERISTICS OF UTILIZABLE PROPERTIES OF MAGNESIUM ALLOY WITH THE HYDROXYAPATITE COATING

AGATA DUDEK<sup>1\*</sup>, MARCIN A. MALIK<sup>2</sup>

CZĘSTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY  
THE FACULTY OF MATERIALS PROCESSING TECHNOLOGY AND  
APPLIED PHYSICS,

<sup>1</sup>INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF CHEMIE

19 ARMII KRAJOWEJ STR., 42-200 CZĘSTOCHOWA, POLAND

\*MAILTO: DUDEK@WIP.PCZ.PL

### Abstract

*Growing interest in biomaterials, combined with opportunities of their use for implants causes, on the one hand, incessantly growing expectations imposed on these materials. On the other hand, new methods and technologies improving their functional properties are required.*

*The industrial application of Mg has increased rapidly in the last 10 years. The increased usage of Mg is due to its lightweight, high specific stiffness and strength. There has been interest in using Mg as a biomaterial for bone replacement as it is biocompatible and bioresorbable.*

*Moreover, mechanical properties of magnesium are closer to natural bones compared with other metallic materials used as biomaterial implants (e.g. Ti alloys, Co-Cr alloys). Magnesium and its alloys are potential biodegradable implant materials due to their attractive biological properties. However, their poor corrosion resistance may result in a sudden failure of the implants.*

*In this study, a magnesium alloy (AZ91) was coated with hydroxyapatite to improve its biodegradation performance. A priority goal of the investigations presented within this work was to improve mechanical properties on the base material – coating interface. These properties were determined by means of scratch tests on the ceramic coating.*

**[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 42-45]**

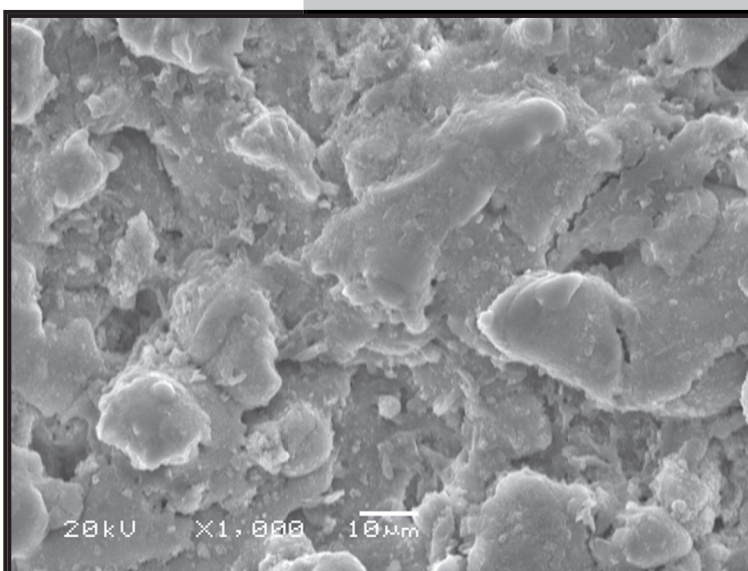
### Introduction

Magnesium alloys has attracted much attention as potential bone implant materials due to their biodegradability and non-toxicity to the human body. However, the surface treatment is necessary to protect against the severe corrosion because Mg is a considerably active metal in chlorides containing solutions including human body fluid or blood plasma. Bioactive coating on Mg alloys might be a way to overcome the above problem [1-4].

Recently, an increased interest in hydroxyapatite coatings used for medical applications has been observed. Hydroxyapatite (HA, HAp)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  implants have been widely used in dentistry, facial surgery, orthopaedics and otolaryngology. It is also used for coatings on other materials, particularly on metals (e.g. coatings for stems of femoral bone prostheses). The factors which impact on quality of the coating include microstructure, chemical and phase composition, adhesion force and solubility in physiological solutions [1-7].

HAp)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  stosuje się w formie powłok na materiałach, głównie metalach (np. pokrycia trzpieni endoprotez stawu biodrowego). Czynniki, które warunkują i wpływają na jakość powłoki są między innymi: mikrostruktura, stopień amorficzności, skład chemiczny i fazowy, siła adhezji oraz rozpuszczalność w roztworach fizjologicznych [1-7].

Głównym, stosowanym na skalę przemysłową sposobem nanoszenia powłok HAp na powierzchnię implantów jest technika plazmowa, wykorzystywana od 1985 roku. Zastosowanie tej techniki (atrakcyjnej ze względów ekonomicznych), prowadzi do uzyskiwania warstw z hydroksyapatytu o grubości w zakresie od 40-400  $\mu\text{m}$  [1,2,5-8]. Powłoki tak otrzymane wykazują większą przyczepność do podłoża i są bardziej spójne wewnętrznie [5-8].



**RYS. 1. Struktura natryskiwanej powłoki.**  
**FIG.1 . The structure of sprayed coating.**

The main method of manufacturing of HA coatings on an industrial scale is plasma technology, which has been used since 1985. The application of this technology (which is attractive mainly due to economic reasons) leads to obtaining hydroxyapatite layers with thickness within the range of 40-400  $\mu\text{m}$  [1,2,5-8]. The obtained HA coatings form fixed bonds with biological tissues and, through the processes of re-

sorption and osseointegration, they create opportunities for bone regeneration based on the ceramic matrix.

## Badania własne

W ramach badań na podłożu stopu magnezu wykonano metodą natryskiwania plazmowego powłokę hydroksyapatytową o grubości około 200 $\mu\text{m}$ .

Celem przeprowadzonych badań była charakterystyka struktury (skaningowy mikroskop elektronowy JOEL JSM 5400) oraz przyczepności powłoki do podłoża stopu magnezu AZ91 (Revetest XPress Plus).

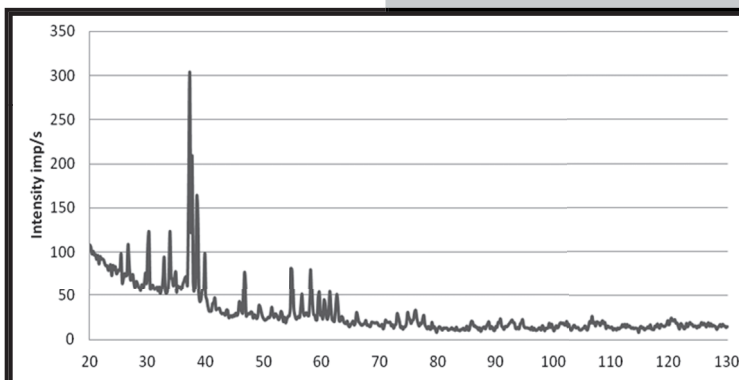
Badania strukturalne przeprowadzone na mikroskopie skaningowym ujawniły typową dla zastosowanej metody nakładania budowę powłoki hydroksyapatytowej (porowatą i laminarną) (RYS. 1).

Z punktu widzenia szerszego wykorzystania biomateriałów, wydaje się być konieczne określenie stabilności fazowej uzyskanych powłok na podłożu stopu AZ91 (RYS. 2).

Analiza fazowa została wykonana przy pomocy dyfraktometru Seifert 3033 T-T przy użyciu lampy kobaltowej. Analiza ujawniła 100% krystaliczną fazę HAp o komórce heksagonalnej i parametrach:  $a=b=0,9418\text{ nm}$ ,  $c=0,6884\text{ nm}$ , P63/m.

Badania przyczepności wykonanych powłok przeprowadzono przy użyciu penetratora Rockwella. Test wykonano stosując następujące parametry: zadane obciążenie: 1 – 180 N, długość rysy: 10 mm, prędkość zarysowania: 3,35 mm/min. Uzyskane wykresy przedstawia RYS. 3. Charakterystykę tę wykonano poprzez analizę siły adhezji powłoki do podłoża, analizę występujących pęknięć i odkształceń oraz obliczenie takich parametrów jak: siła i współczynnik tarcia oraz siła krytyczna.

Głębokość „zarysowanego” obszaru (jego wymiary liniowe) były ściśle uzależnione od zadanych parametrów testu. Wraz ze wzrostem zadanej siły, następowała zmiana profilu linii zarysowania. Stykające się powierzchnie (penetra-



**FIG. 2. Dyfraktogram natryskiwanej powłoki.**  
**FIG. 2. Diffractogram for coatings.**

## Investigations

The investigations encompassed hydroxyapatite layers with thickness of ca. 200  $\mu\text{m}$  (FIG. 1) obtained by means of plasma spraying on the surface of AZ91 alloy. The aim of this study was to characterize the structure (a scanning electron microscope JOEL JSM 5400) and the adhesion of the coating (Revetest XPress Plus) to the surface of the magnesium alloy. Microscopic obser-

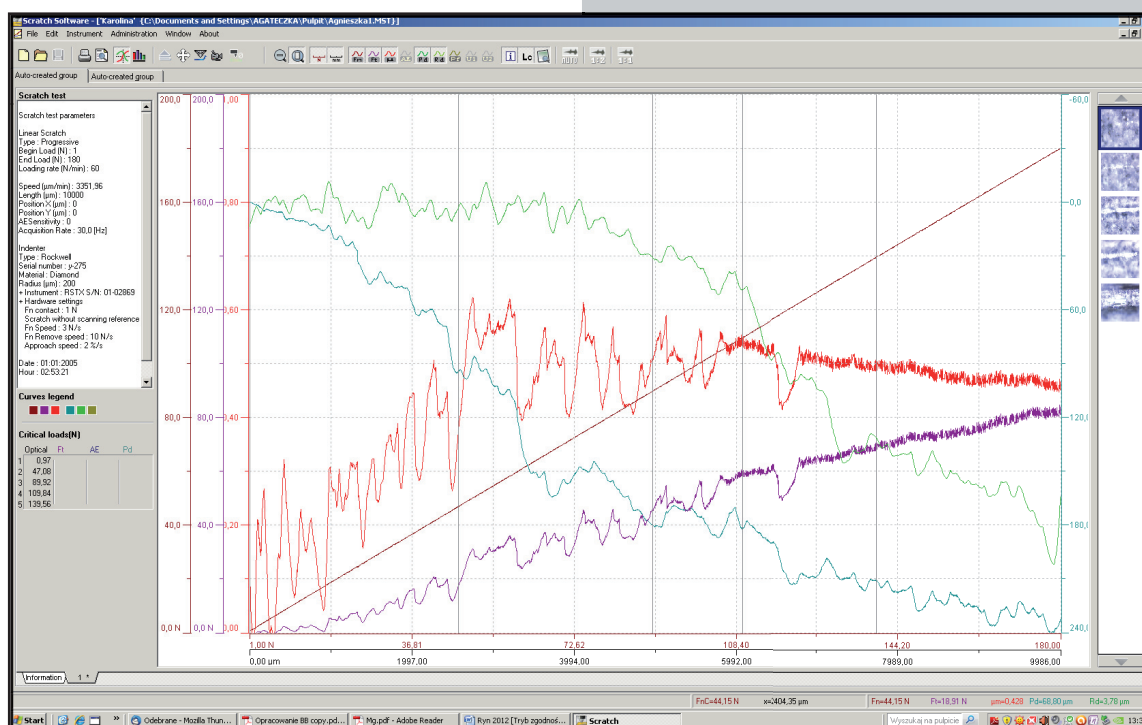
vations of the sprayed coatings revealed a structure typical of the employed method of manufacturing. These coatings were characterized by laminarity and porosity between individual layers of the solidifying material.

It seems to be necessary, from the standpoint of wider use of composite materials, to determine phase stability in the obtained composites. Phase analysis was carried out using Seifert 3033 T-T X-ray diffractometer (XRD) with radiation wavelength of  $\lambda_{\text{Co}}$ ,  $K_{\alpha}=0,17902\text{ nm}$ . The XRD qualitative analysis of hydroxyapatite coatings revealed its 100% crystallinity and presence of hexagonal phase of HA with the following parameters of the cell:  $a=b=0,9418\text{ nm}$ ,  $c=0,6884\text{ nm}$ , space group P63/m.

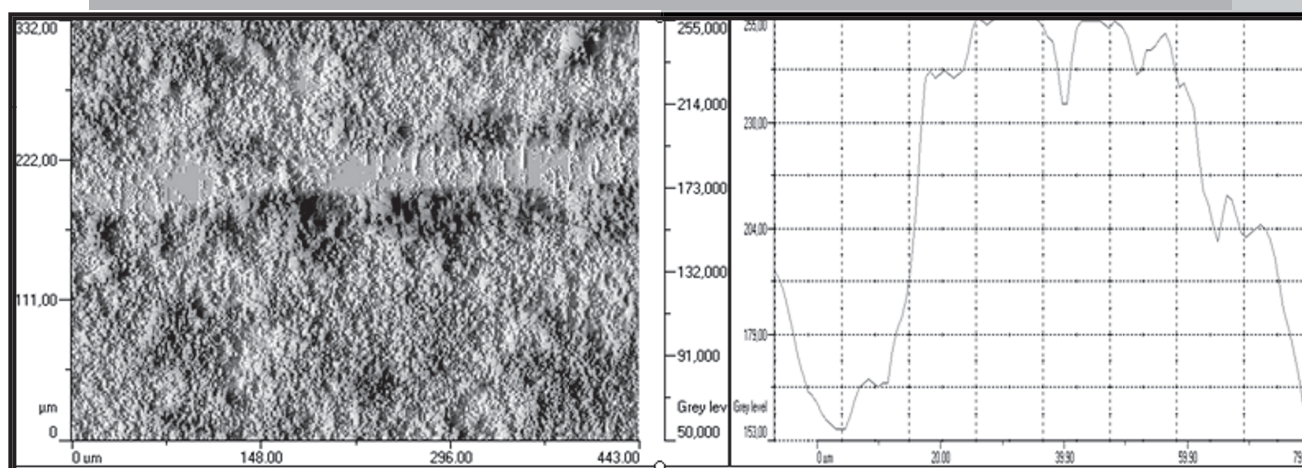
The purpose of the investigations was to characterize mechanical properties of the coating – implant interface. The adhesion force of the coating to the base material, cracks and deformations were analysed. Then, the following parameters were calculated: force and a coefficient of friction as well as critical force.

Adhesion tests for the coatings were carried out by means of Revetest XPress Plus device with Rockwell indenter. The tests were carried out using the following parameters: load of 1 – 180 N, scratch length: 10 mm, scratch rate: 3,35 mm/min. The obtained results are presented in FIGS. 3, 4.





RYS. 3. Wykresy powstałe w wyniku zarysowania powłoki hydroksyapatytowej.  
FIG. 3. Charts obtained as a result of scratching.



RYS. 4. Geometria powstałej linii zarysowania.  
FIG. 4. Scratch line geometry.

tor-powłoka) znajdując się w złożonym stanie naprężeń i odkształceń, prowadziły do osiągnięcia wartości krytycznych dla poszczególnych badanych powłok.

Zautomatyzowane obserwacje mikroskopowe pozwoliły na analizę linii zarysowania na całej zadanej długości. Przykładowy wykres geometrii zarysowania przedstawiono na RYS. 4.

## Podsumowanie

- Znana bioaktywność ceramiki hydroksyapatytowej sugeruje, że powłoka wykonana z tego materiału powinna być skutecznym sposobem na poprawę bioaktywności powierzchni stopu magnezu.
- W wyniku napyłania plazmowego otrzymano 200 μm powłokę hydroksyapatytu na podłożu stopu magnezu AZ91.
- Natryskiwane powłoki wykazały laminarność oraz porowatość ułożoną pomiędzy poszczególnymi warstwami krzepnącego materiału.

The depth of the scratched area (its linear dimensions) was closely dependent on the adopted test parameters. An increase of the applied force caused change in the scratch line profile. The adjacent surfaces (i.e. indenter – coating) were in a complex state of stresses and deformations, leading to reaching critical values for each of the investigated coatings.

Automated microscope observations enabled analysis of the scratch line throughout the whole length. An example of scratch geometry chart is presented in FIG. 4.

## Conclusions

- The bioactivity of the hydroxyapatite ceramic suggested that the HA coating should be an effective way to improve the surface bioactivity of Mg alloy.
- As a result of plasma spraying, the 200 μm thick hydroxyapatite coating was obtained.



- Analiza składu fazowego potwierdziła wysoką stabilność termiczną ceramiki hydroksyapatytowej podczas natryskiwania.
- Przeprowadzone badania przyczepności powłok bioceramicznych, pozwoliły na charakterystykę układu powłoka/podłoże [HAp/AZ91] poprzez wartości takich parametrów jak: współczynnik tarcia, siła tarcia, krytyczna siła obciążenia powłok, przy której ulegały one rozwarstwieniu ( $L_k=120N$ ).

- Some flaws and pores, which are advantageous for bone implantation, exist on the coating surface. The porosity in the thermal spray coatings can be in a form of open and closed pores.
- XRD structural analysis confirmed the high thermal stability of the hydroxyapatite powder which was used for the fabrication of the coatings.
- The investigations of adhesion force in the bioceramic coatings allowed to characterise the coating/base material system [HAp/AZ91] through analysis of the following values: a friction coefficient, friction force, critical load force at which the coatings were separated from the alloy surface.

## Piśmiennictwo

- [1] Marciniak J.: Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2002.
- [2] Ślósarczyk A.: Biomateriały ceramiczne, Biocybernetyka I Inżynieria Biomedyczna 2000, tom 4, Biomateriały pod redakcją S. Błażewicza, L. Stocha, AOW EXIT Warszawa, 2003.
- [3] Seitz J. M., Wulf E., Freytag P., Bormann D., Bach F. W. (2010). The Manufacture of Resorbable Suture Material from Magnesium. *Advanced Engineering Materials*, 12, 1099–105, 2011.
- [4] Witte, F., et al.: „In Vivo Corrosion of Four Magnesium Alloys and the Associated Bone Response”, *Biomaterials*, 26(17)(2005), pp. 3557-3563.

## References

- [5] DUDEK A.: Microstructure and Properties of the Composites: Hydroxyapatite with Addition of Zirconia Phase, *J. Eng. Mater. Technol.*, 133, 2011, pp. 021006-1 - 021006-5.
- [6] Dudek A., Przerada I., Bałaga Z., Morel S.: Krystalizacja natryskiwanej plazmowo powłoki hydroksyapatytowej, *Inżynieria Materiałowa*, Nr 6, 2008.
- [7] DUDEK A.: Surface properties in titanium with hydroxyapatite coatings, *Optica Applicata*, XXXIX, No. 4, 2009
- [8] Dudek A., Nitkiewicz Z.: Structural Analysis of Hydroxyapatite Sinters with Addition of  $ZrO_2$  Phase. *Mater. Sci. Forum* Vol.638-642, 2010, s.658-663.

## ANALIZA ZMIAN W EKSPRESJI GENÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO W KOMÓRKACH OSTEOLASTÓW HODOWANYCH NA POWIERZCHNIACH STOPÓW TYTANU

M.WALKOWIAK-PRZYBYŁO<sup>1\*</sup>, P.KOMOROWSKI<sup>2</sup>, W.JAKUBOWSKI<sup>2</sup>, L.KLIMEK<sup>1</sup>, B.WALKOWIAK<sup>2</sup>

POLITECHNIKA ŁÓDZKA:

<sup>1</sup>ZAKŁAD BADAŃ MATERIAŁÓW,

<sup>2</sup>ZAKŁAD BIOFIZYKI

\*MAILTO:MMWALKOWIAK@WP.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 46-48]

Ze względu na rosnącą potrzebę szybkiej i wiarygodnej weryfikacji biogodności nowych materiałów przeznaczonych do implantacji, zastosowanie technik biologii molekularnej w obszarze inżynierii biomateriałów nabiera coraz większego znaczenia. Wiadomo, że wszczepiony biomateriał nie pozostaje obojętny wobec kontaktujących się z nim komórek i może być postrzegany jako potencjalne źródło stresu. Efektem mogą być zmiany w ekspresji genów i białek, przejawiające się w zróżnicowanej odpowiedzi metabolicznej komórek, co z kolei może mieć przełożenie na ostateczną akceptację implantu przez tkanki i organizm biorcy. Powyższe obserwacje skłaniają do sformułowania następującej tezy: Zarówno skład chemiczny biomateriału, jak i struktura jego powierzchni, wywierają mierzalny wpływ na metaboliczną odpowiedź komórek kontaktujących się z tą powierzchnią.

Badaniem aktywności genów ulegających ekspresji w komórce zajmuje się transkryptomika, wykorzystująca różnorodne techniki biologii molekularnej (qRT-PCR, Northern blotting, mikromacierze cDNA). Celem naszej pracy jest analiza zmian w ekspresji genów cyklu komórkowego w komórkach ludzkich osteoblastów linii Saos-2 (ATCC, Manassas, USA) hodowanych na polerowanych i piaskowanych powierzchniach stopów tytanu Ti6Al4V (ISO 5832-3) oraz Ti6Al7Nb (ISO-5832-11), z wykorzystaniem zestawu mikromacierzy cDNA (Cell Cycle Oligo GEMArray-Human, SABiosciences). Pomimo wieloletniej i bardzo szerokiej aplikacji tytanu i jego stopów w obszarze implantologii i medycyny, nadal nie w pełni poznano molekularny aspekt interakcji tytan/stop tytanu-komórka.

Próbki stopów tytanu o wymiarach 3 mm grubości oraz 20 mm średnicy szlifowano na wodnych papierach ściernych o malejącej gradacji ziaren, a następnie polerowano zawieszoną tlenkową na bazie koloidalnego roztworu krzemionki (Struers). Część krążków poddano następnie piaskowaniu ziarnem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o wielkości 110 µm, padającym pod kątem 45° przy ciśnieniu 4,5 Bar. Próbki myto w myłce ultradźwiękowej w acetonie przez 10 min i w wodzie dejonizowanej przez kolejne 10 min.

Hodowlę osteoblastów na polerowanych i piaskowanych powierzchniach Ti6Al4V i Ti6Al7Nb poprzedzono sterylizacją parową badanych krążków. Po sterylizacji próbki inkubowano przez 48h z zawieszoną osteoblastów w pełnym medium hodowlanym (McCoy's 5a Modified Medium z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), penicyliny i streptomycyny) w temperaturze 37°C, przy wilgotności względnej 100%, w obecności 5% CO<sub>2</sub>. Równolegle przygotowano próby kontrolne, które stanowiły komórki nie poddane kontaktowi z biomateriałem (kontrola) oraz komórki podda-

## ANALYSIS OF CHANGES IN CELL CYCLE GENE EXPRESSION IN OSTEOLASTS CULTURED ON THE SURFACES OF TITANIUM ALLOYS

M.WALKOWIAK-PRZYBYŁO<sup>1\*</sup>, P.KOMOROWSKI<sup>2</sup>, W.JAKUBOWSKI<sup>2</sup>, L.KLIMEK<sup>1</sup>, B.WALKOWIAK<sup>2</sup>

TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ:

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF MATERIALS' RESEARCH,

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS

\*MAILTO: MMWALKOWIAK@WP.PL

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 46-48]

Due to the increasing need for rapid and reliable verification of biocompatibility of new materials intended for implantation, the application of molecular biology techniques in the field of biomaterials engineering is becoming extremely important. It is commonly known that implanted material is not neutral for cells contacting its surface and can be considered as the potential source of stress for these cells. As a result of implant-cell interaction changes in genes and proteins' expression, manifested in metabolic cell response, can be observed, and they may be related with the final implant acceptance by the patient's tissues. Above observations have lead to the formulation of the following thesis: Both the biomaterial composition and its surface topography, have a measurable impact on the metabolic response of cells being in contact with the surface of biomaterial.

The discipline that enables to evaluate the activity of genes undergoing expression in cells is transcriptomics, using various techniques of molecular biology (qRT-PCR, Northern blotting, cDNA microarrays). The aim of our study is to analyze changes in cell cycle gene expression in human osteoblasts line Saos-2 (ATCC, Manassas, USA) cultured on polished and sandblasted surfaces of titanium alloys Ti6Al4V (ISO 5832-3) and Ti6Al7Nb (ISO-5832-11), with the use of cDNA microarrays (Cell Cycle Oligo GEMArray-Human, SABiosciences). Despite the long and very broad applications of titanium and its alloys in the field of implantology and medicine, the molecular aspect of titanium/titanium alloy-cell interaction is still not well understood.

Disc-shaped samples of titanium alloys, 20 mm in diameter and 3 mm thick, were grinded on abrasive papers of decreasing grain grit and polished with silica-based paste (Struers). Additionally, some samples of each alloy were sandblasted with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> grains 110 µm in size, hitting the surface at a 45° angle and a pressure of 4,5 Bar. Then the samples were cleaned in an ultrasonic bath in acetone for 10 minutes and in deionised water for the next 10 minutes.

The culture of Saos-2 cells on polished and sandblasted surfaces of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys was preceded with steam sterilization of the samples. After autoclaving the samples were incubated for 48h with suspension of osteoblastic cells Saos-2 in full medium (McCoy's 5a Modified Medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin) at 37°C, in the atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and relative humidity 100%. Control samples were prepared as well: cells that were not in contact with any examined material (control) and cells that were grown on the surface of polished medical steel AISI 316L (reference sample). After 48h the cells on the examined surfaces were lysed with a solution of phenol and guanidine isothiocyanate (TRIzol Reagent) and RNA isolation procedure was performed.

ne kontaktowi z polerowaną powierzchnią stali medycznej AISI 316L (tzw. próbka referencyjna). Po upływie 48h komórki na badanych powierzchniach lizowano za pomocą roztworu fenolu i izotiocyanianu guanidyny (TRIzol Reagent) i przeprowadzano procedurę izolacji RNA. Następnie cząsteczki RNA amplifikowano i znakowano biotyną przy użyciu zestawu MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit (Ambion). Membrany mikromacierzy poddane wcześniej prehybrydacji inkubowano z próbkami RNA przez 12h w 60°C, następnie blokowano wolne miejsca buforem blokującym i inkubowano z kompleksem streptawidyna-fosfataza alkaliczna. Dodatek CDP-Star umożliwił uzyskanie obrazu transkryptomu metodą chemiluminescencyjną na filmie rentgenowskim. Do analizy densytometrycznej obrazów mikromacierzy wykorzystano program ImageQuant TL (GE Healthcare). Przykładowe obrazy mikromacierzy dla polerowanych stopów Ti6Al4V i Ti6Al7Nb przedstawia RYS.1.

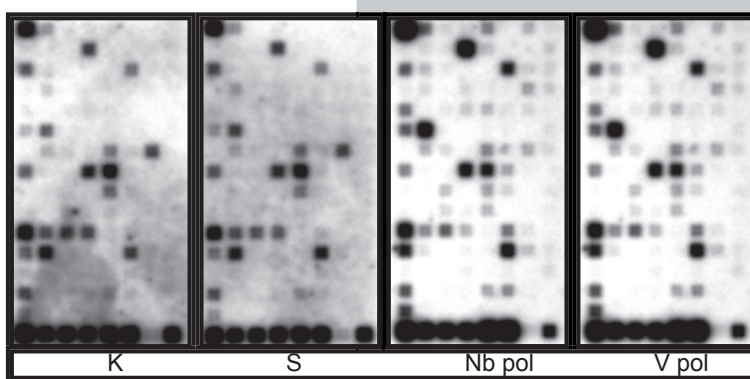
Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- Analiza transkryptomu osteoblastów hodowanych na powierzchniach badanych stopów tytanu oraz próbce referencyjnej wykazała liczne, znaczące zmiany w ekspresji genów w stosunku do hodowli kontrolnej.

- Kontakt osteoblastów z powierzchnią V pol, Nb pol i Nb piasek spowodował włączenie trzech genów (100% nadekspresja). Są to dwa geny odpowiedzialne za punkty kontrolne i zatrzymanie cyklu komórkowego oraz gen odpowiedzialny za prawidłowy przebieg fazy G2 i przejścia fazy G2 w fazę M.

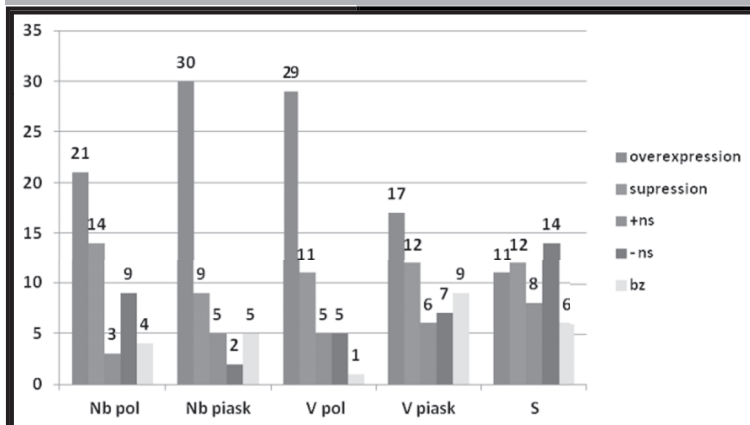
- Istotne zmiany w ekspresji dotyczą od 23 do 40 genów cyklu komórkowego, przy czym największą ilość zmian zaobserwowano dla polerowanego stopu Ti6Al4V, a najmniejszą - dla referencyjnej próbki stalowej (RYS.2.).

- Najczęstszym mechanizmem zmian w komórkach osteoblastów poddanych kontaktowi z badanymi sto-



**RYS. 1.** Obrazy mikromacierzy cyklu komórkowego po hybrydyzacji z transkryptomem osteoblastów hodowanych na powierzchniach polerowanych stopów tytanu, kontroli i próbce referencyjnej: K - kontrola, S - stal AISI 316 L, Nb pol - polerowany Ti6Al7Nb, V pol - polerowany Ti6Al4V.

**FIG. 1.** Images of the cell cycle microarray after hybridization with the transcriptome of osteoblasts cultured on polished titanium alloys, control and reference sample: K - control, S - stainless steel AISI 316 L, Nb pol - polished Ti6Al7Nb, V pol - polished Ti6Al4V.



**RYS. 2.** Liczba i rodzaj zmian w ekspresji genów cyklu komórkowego w komórkach osteoblastów hodowanych na powierzchniach badanych biomateriałów. Za nadekspresję genów przyjęto wartość ilorazu intensywności zaczernienia spotu badanego do spotu kontrolnego większą lub równą 1,25; za supresję – wartość ilorazu intensywności zaczernienia spotu badanego do spotu kontrolnego mniejszą lub równą 0,75; zmiany w ekspresji genów o mniejszej intensywności, nieistotnie statystycznie wyszczególniono jako + ns (nadekspresja ns) lub - ns (supresja ns), natomiast brak zmian oznaczono jako bz; Nb piasek – piaskowany Ti6Al7Nb, V piasek – piaskowany Ti6Al4V.

**FIG. 2.** The number and type of changes in cell cycle gene expression in osteoblast cells cultured on the surfaces of tested biomaterials. Genes overexpression is determined for test to control spot volume ratio greater than or equal to 1.25, the suppression – for test to control spot volume ratio less than or equal to 0.75, changes in gene expression of a lower intensity, not statistically significant are listed as + ns (ns overexpression) or - ns (ns suppression), whereas no changes were determined as bz; Nb piasek - sandblasted Ti6Al7Nb, V piasek - sandblasted Ti6Al4V.

polished Ti6Al4V alloy, and the lowest - for the reference sample (FIG.2).

- The most common mechanism of changes in osteoblastic cells cultured in the presence of examined titanium alloys, regardless of their surface modification, is overexpression (the increase of gene expression).

Then the molecules of RNA were amplified and biotin-labeled with the use of MessageAmp™ II-Biotin Enhanced Kit (Ambion). Microarray membranes subjected to a previous hybridization were incubated with the RNA samples for 12h at 60°C, then blocked with blocking buffer and incubated with a complex of streptavidin-alkaline phosphatase. Addition of CDP-Star allowed to obtain an image of transcriptome on X-ray film by the chemiluminescence method. For densitometric analysis of microarrays ImageQuant TL program (GE Healthcare) was used. Microarrays images for polished Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys are shown in FIG.1

Based on our study the following conclusions are made:

- Analysis of the transcriptome of osteoblasts cultured on polished and sandblasted surfaces of titanium alloys and the reference sample indicated numerous, significant changes in gene expression compared to control culture.

- Contact of osteoblasts with the surface of V pol, Nb pol and Nb piasek resulted in the turning on of three genes (100% overexpression). These are two genes responsible for the cell cycle checkpoints and cell cycle arrest and one gene responsible for G2 phase and G2/M phase transition.

- Significant changes in gene expression include 23 to 40 genes of the cell cycle, with the largest number of changes observed for



pami tytanu, niezależnie od ich modyfikacji powierzchniowej, jest nadekspresja (wzrost ekspresji genów).

## Podziękowania

Badania finansowane w ramach projektu „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.

## Acknowledgements

This study was financially supported by „DIAHAP: New carbon-hydroxyapatite nanocomposites on metallic bases applied in medicine”.

## METODA WYTWARZANIA KOMPOZYTÓW METALICZNO- CERAMICZNYCH Ti+HAp I JEJ WPŁYW NA WŁASNOŚCI STRUKTURALNE

MAGDALENA KLIMAS\*, AGATA DUDEK

POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ MATERIAŁOWEJ I FIZYKI STOSOWANEJ,  
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
AL. ARMII KRAJOWEJ 19, 42-200 CZĘSTOCHOWA, POLSKA  
\*MAILTO: MAGDAKLIMAS@WIP.PCZ.PL

## METHOD OF OBTAINING METALLIC-CERAMIC COMPOSITES OF Ti + HAp AND ITS EFFECT ON STRUCTURAL PROPERTIES

MAGDALENA KLIMAS\*, AGATA DUDEK

CZĘSTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY  
THE FACULTY OF MATERIALS PROCESSING TECHNOLOGY AND  
APPLIED PHYSICS, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
19 ARMII KRAJOWEJ AVE., 42-200 CZĘSTOCHOWA, POLAND  
\*MAILTO: MAGDAKLIMAS@WIP.PCZ.PL

## Streszczenie

W artykule przedstawiono wpływ metody wytwarzania kompozytu metaliczno – ceramicznego Ti+HAp na jego własności strukturalne. Badania zostały wykonane na próbkach o osnowie tytanu zawierających od 20 do 50% HAp uzyskanych metodą metalurgii proszków, spiekanych w próżni o wartości  $10^{-4}$  Pa oraz atmosferze argonu. Podczas badań dokonano analizy mikrostrukturalnej otrzymanych próbek, określono skład fazowy występujący w badanym materiale, oznaczono gęstość pozorną kompozytów przed i po spiekaniu. Dodatkowo wyznaczono zmianę liniową i objętościową, jaka towarzyszyła kompozytom.

**Słowa kluczowe:** kompozyty, tytan, hydroksyapatyt, metalurgia proszków  
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 48-51]

## Wprowadzenie

Tytan posiadając dobre własności mechanicznych, wysoką odporność korozyjną oraz najlepszą wśród biomateriałów obojętność biologiczną, jest stosowany w różnych dziedzinach medycyny [1,2]. Stosowanie tytanu ogranicza jednak zjawisko metalozy, jak również niska odporność na ścieranie [3,4]. Pomocne w tym przypadku może być wytworzenie kompozytów Ti+HAp, łączących zalety materiałów metalicznych, uzupełnianych unikalnymi własnościami ma-

## Abstract

The paper presents the effect of a method of obtaining a metallic-ceramic composite Ti+HAp on its structural properties. The examinations were carried out on the samples with titanium matrix which contained from 20 to 50% of HAp obtained by means of powder metallurgy, sintered in vacuum with pressure of  $10^{-4}$  Pa and in argon atmosphere. The microstructural analysis of the obtained samples was carried out and phase composition was determined for the materials studied. Furthermore, the authors determined bulk density of composites before and after sintering as well as linear and volumetric changes observed for the composites.

**Keywords:** composites, titanium, hydroxyapatite, powder metallurgy  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 48-51]

## Introduction

Titanium, famous for its excellent mechanical properties, high resistance to corrosion and best biological compatibility among biomaterials, has been used in different areas of medical applications [1,2]. The use of titanium, however, is limited by the phenomenon of metallosis and exhibits low resistance to wear [3, 4]. In such cases, obtaining composites of Ti+HAp that combine the advantages of metallic ma-

teriałów ceramicznych [1,5]. Jedną z metod otrzymywania materiałów tytanowych jest metalurgia proszków pozwalająca na uzyskanie jednorodnej, drobnoziarnistej struktury o lepszych właściwościach użytkowych niż w przypadku otrzymywania tych materiałów inną metodą. Dodatkowo umożliwia ona wprowadzenie do czystego proszku tytanu czy jego stopu dodatkowych składników, pozwalając w ten sposób na modyfikację składu chemicznego uzyskiwanych materiałów implantacyjnych [5]. Dodatkową zaletą uzyskiwania tytanu, jego stopów jak również kompozytów metaliczno – ceramicznych jest możliwość uzyskiwania materiałów porowatych, co ma szczególne znaczenie w implantologii, ponieważ umożliwia szybkie a zarazem głębokie narastanie tkanki kostnej powodując lepsze umocnienie implantu w organizmie człowieka [1,3,4].

## Materiały i metody

Materiałem do badań były próbki wykonane metodą metalurgii proszków. Do wytworzenia kompozytów metaliczno – ceramicznych wykorzystano proszki HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) oraz Ti o udziale hydroksyapatytu zmieniającym się w zakresie 20–50% wag. Po ujednoliciu mieszanin odpowiednich kompozycji proszki zostały sprasowane jednoosiowo przy obciążeniu 270 MPa oraz wysuszone w suszarce laboratoryjnej. Część wyprasek poddano procesowi spiekania w atmosferze argonu w temperaturze 1100°C przez czas 1 godziny. Druga część wyprasek o identycznym składzie masowym jak wcześniejsze została poddana procesowi spiekania w próżni również w temperaturze 1100°C przez czas 1 godziny.

Otrzymane metodą metalurgii proszków kompozyty metaliczno – ceramiczne poddano badaniom mikrostrukturalnym, rentgenowskiej analizie jakościowej, ocenie gęstości oraz analizie zmian liniowych i objętościowych po procesie spiekania.

## Wyniki i dyskusja

Otrzymane metodą metalurgii proszków kompozyty poddano badaniom mikrostrukturalnym stosując mikroskop optyczny Axiovert. Otrzymane mikrostruktury przedstawiono na RYS. 1.

Obserwacje mikroskopowe ujawniły równomierne rozmieszczenie poszczególnych faz, w ilości zależne od dodatku objętościowego poszczególnych faz. Ciemne pola na widocznym mikrostrukturach to faza hydroksyapatytu natomiast jasne to tytan. W tytanie podczas spiekania ujawniono nieliczne mikropęknięcia.

W celu określenia struktury otrzymanych kompozytów metaliczno - ceramicznych badane próbki poddano rentgenowskiej analizie jakościowej Seifert 3003 T - T. Uzyskane dyfraktogramy wraz z pikami pochodzącymi od ujawnio-

terials with unique properties of ceramics [1,5] can be very useful. One of the methods of obtaining titanium materials is powder metallurgy that allows for obtaining homogeneous, fine-grain structure with improved functional properties compared to the material obtained by means of other methods. Furthermore, this method offers opportunities for introducing, to pure titanium powder or its alloy, additional components which in consequence make it easy to modify chemical composition of implantation materials [5]. An additional advantage of using titanium, its alloys and metallic-ceramic composites is obtaining porous materials, which is of essential importance in implantology as it facilitates very fast and deep osseointegration, causing better fixation of the implant within human body [1,3,4].

## Materials and methods

The materials used in the study were samples made by means of powder metallurgy. In order to obtain metallic and ceramic composites, the authors used powders of HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) and Ti with hydroxyapatite fraction which ranges from 20wt% to 50wt%. After homogenization of the mixtures of particular compositions, the powders were axially compressed at the load of 270 MPa and dried in a laboratory drier. A part of moulded pieces were sintered in argon atmosphere at the temperature 1100°C for the time of 1 hour. The other part of the moulded pieces, with identical mass composition, was also sintered in vacuum at temperature of 1100°C for 1 hour.

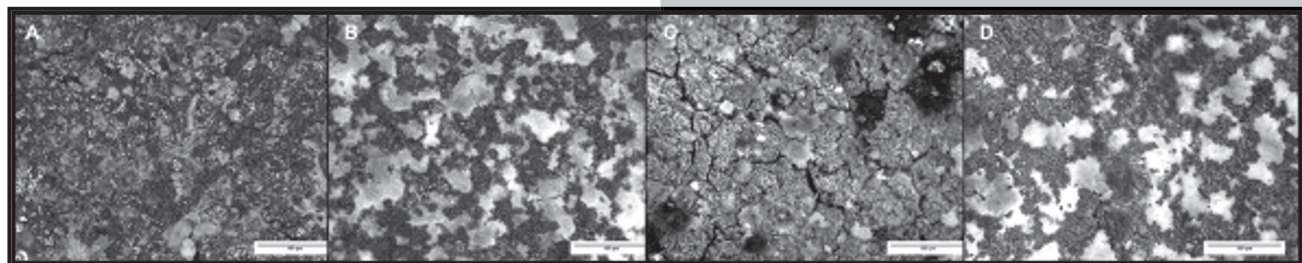
The metallic and ceramic composites obtained by means of powder metallurgy were then used for microstructural examinations, X-ray quality analysis, determination of density and analysis of linear and volumetric changes after the process of sintering.

## Results and discussion

The composites obtained by means of powder metallurgy were used for microstructural examinations using Axiovert optical microscope. The microstructures obtained are presented in FIG. 1.

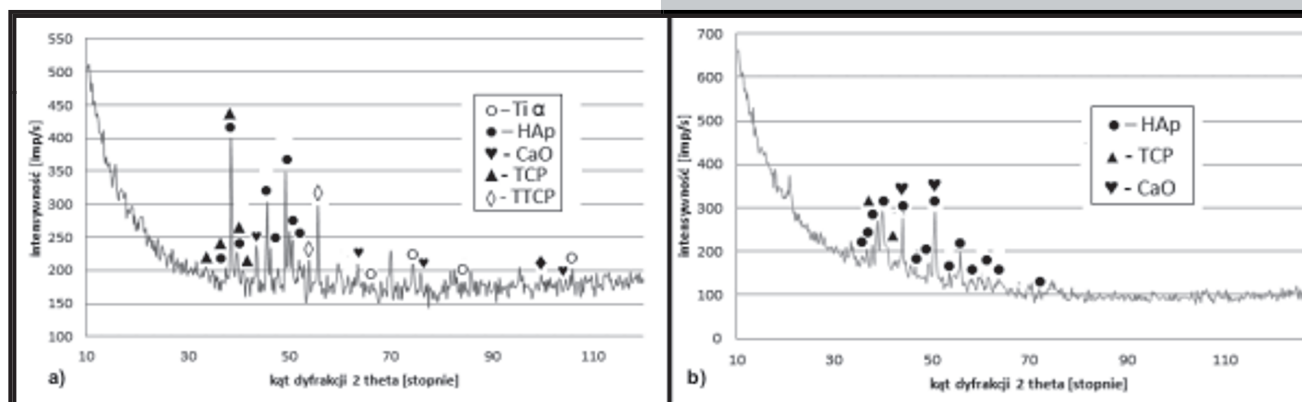
Microscopic observations revealed even distribution of individual phases, with amount which depended on volumetric addition of individual phases. Black fields in visible microstructures represent hydroxyapatite whereas blank ones are titanium. Sparse microcracks were observed in titanium after sintering.

In order to determine the structure of metallic-ceramic composites, an X-ray quality analysis was carried out on the samples using Seifert 3003 T - T. The obtained diffractograms with peaks from phases found for the samples heated in argon atmosphere and in vacuum are presented by FIG. 2.



RYS. 1. Mikrostruktury próbek kompozytów: a) 20% HAp + 80% Ti, b) 50% HAp + 50% Ti po spiekanii w próżni c) 20% HAp + 80% Ti, d) 50% HAp + 50% Ti po spiekanii w atmosferze argonu.

FIG. 1. Microstructure in composite samples: a) 20% HAp + 80% Ti, b) 50% HAp + 50% Ti after sintering in vacuum c) 20% HAp + 80% Ti, d) 50% HAp + 50% Ti after sintering in argon atmosphere.



RYS. 2. Dyfraktogramy próbek 50% HAp + 50% Ti po wygrzewaniu a) w próżni, b) w atmosferze argonu.  
FIG. 2. Sample diffractograms 50% HAp + 50% Ti after annealing a) in vacuum, b) in argon atmosphere.

nych faz dla próbek wygrzewanych w atmosferze argonu i w próżni przedstawia RYS. 2.

W przypadku próbek wygrzewanych w próżni na dyfraktogramach zidentyfikowano refleksy pochodzące od tytanu  $\alpha$  i HAp oraz dodatkowo takie fazy jak CaO, TCP o wzorze chemicznym  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  i TTCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ), które powstały w wyniku dekompozycji fazy HAp, która to zachodzi w wyniku wygrzewania próbek.

Dyfraktogramy próbek z niską zawartością hydroksyapatytu, wygrzewanych w atmosferze argonu, składają się z pików pochodzących od faz Ti  $\alpha$  oraz HAp. Dopiero zawartość HAp na poziomie 50% powoduje pojawienie się podobnie jak w przypadku próbek wygrzewanych w próżni faz TCP oraz CaO. Nie można również wykluczyć, że w przypadku mniejszej zawartości HAp (<50%) obecność faz CaO i TCP będących dowodem na dekompozycję fazy HAp znajduje się poniżej granicy wykrywalności metodą rentgenograficzną.

Dla kompozytów metaliczno – ceramicznych wyznaczono gęstość pozorną przed i po spiekaniu. Na RYS. 3 przedstawiono odpowiednio zmianę gęstości pozornej kompozytów na bazie tytanu przed i po spiekaniu w atmosferze argonu oraz próżni.

Określono również zmianę liniową i objętościową, jaka towarzyszyła próbkom po spiekaniu w różnych atmosferach, co przedstawia RYS. 4.

Wyniki gęstości pozornej dla próbek wygrzewanych w atmosferze argonu zmieniły się od  $3,48 \text{ g/cm}^3$  dla próbki z czystego tytanu do  $1,68 \text{ g/cm}^3$  dla próbek zawierających 40% HAp. W przypadku próbek wygrzewanych w próżni gęstość spieków zmienia się od  $2,03 \text{ g/cm}^3$  dla próbek zawierających 80% Ti do  $1,95 \text{ g/cm}^3$  dla próbek zawierających 50% Ti. W przypadku próbek wygrzewanych w atmosferze argonu następuje wzrost gęstości spieku w porównaniu z uzy-

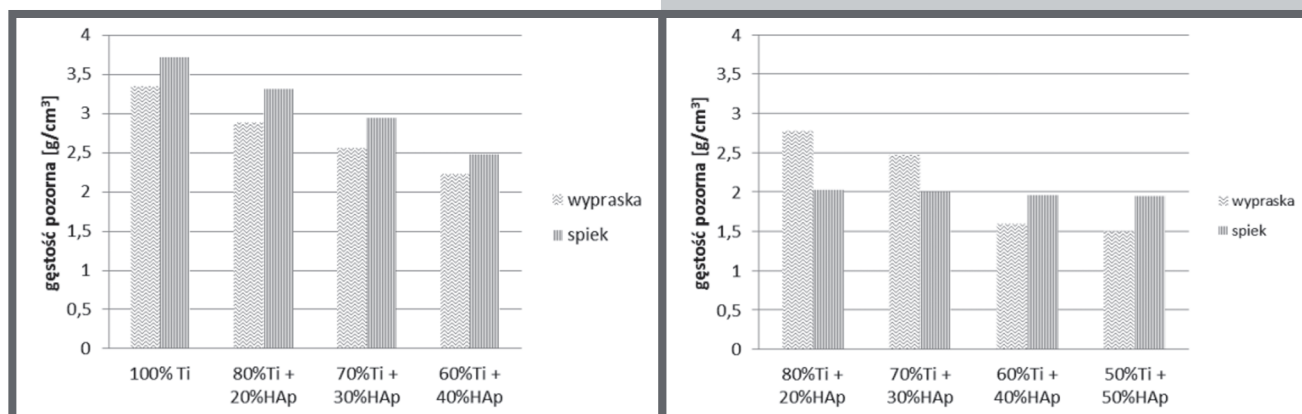
In the case of the samples annealed in vacuum, the diffractograms exhibited reflexes from titanium  $\alpha$  and HAp and such phases as CaO, TCP with chemical formula of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and TTCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ), which were formed as a result of decomposition of HAp phase that occurs as a result of sample annealing.

Sample diffractograms with low content of hydroxyapatite, annealed in the atmosphere of argon, are composed of the peaks from phases Ti  $\alpha$  and HAp. It is only the content of HAp at the level of 50% that causes presence of TCP and CaO phases observed in the samples annealed in vacuum. It cannot be excluded that in the case of lower content of HAp (<50%), presence of CaO and TCP phases, which confirm decomposition of HAp phase, is below the detection threshold using X-ray method.

Bulk density for metallic and ceramic composites was determined before and after sintering. FIG. 3 presents a change in bulk density in composites based on titanium before and after sintering in the atmosphere of argon and in vacuum.

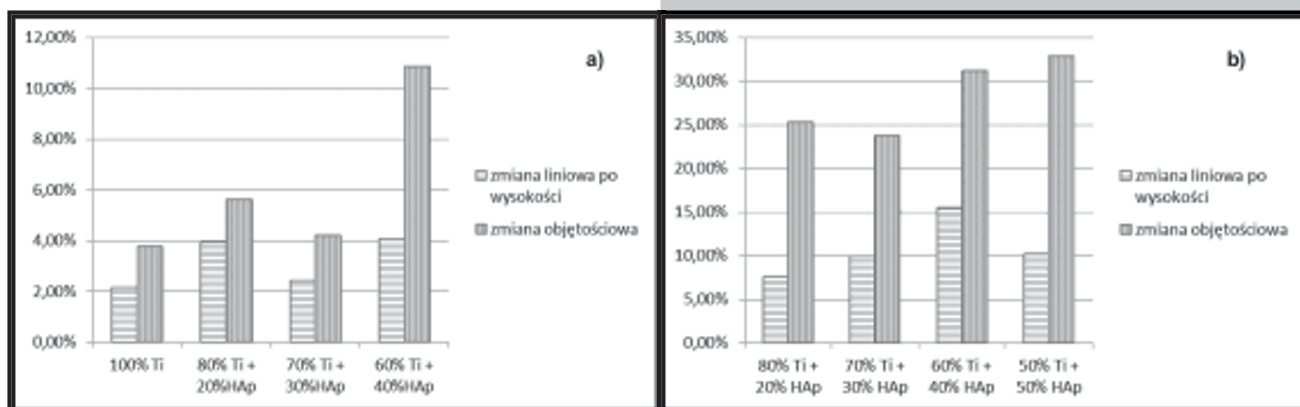
Linear and volumetric changes which were observed for the samples after sintering in different atmospheres were also determined, which is presented by FIG. 4.

The results obtained for bulk density for samples annealed in argon atmosphere ranged from  $3.48 \text{ g/cm}^3$  for the sample of pure titanium to  $1.68 \text{ g/cm}^3$  for the samples with 40% HAp. In the case of the samples annealed in vacuum, sinter density ranged from  $2.03 \text{ g/cm}^3$  for the samples containing 80% Ti to  $1.95 \text{ g/cm}^3$  for the samples with 50% Ti. In the case of the samples annealed in the atmosphere of argon, an increase in sinter density was observed compared with the obtained moulded pieces, whereas in the samples sintered in vacuum, a decline in sinter density occurs com-



RYS. 3. Gęstość pozorną kompozytów Ti+HAp przed i po spiekaniu w a) atmosferze argonu b) próżni.  
FIG. 3. Bulk density of Ti+HAp composites before and after sintering in a) argon atmosphere, b) vacuum.





**RYS. 4.** Zmiana liniowa po wysokość i zmiana objętościowa dla kompozytów Ti+HAp spiekanych w a) atmosferze argonu, b) próżni.

**FIG. 4.** Linear changes in height and volumetric changes for Ti+HAp composites sintered in: a) argon atmosphere, b) vacuum.

skanymi wypraskami, natomiast w przypadku próbek spiekanych w próżni następuje spadek gęstości spieków w porównaniu z gęstością uzyskanych wyprasek aż do zawartości HAp na poziomie 40%, kiedy to gęstość spieku zaczyna być wyższa od gęstości wypraski.

W przypadku próbek wygrzewanych w próżni obserwuje się ekspansję spieku w stosunku do uzyskanej wypraski, natomiast w przypadku próbek wygrzewanych w atmosferze argonu obserwuje się ich kontrakcję.

Zarówno dla próbek wygrzewanych w atmosferze argonu jak i wygrzewanych w próżni zmiana objętościowa jak i liniowa po wysokości wzrasta wraz z dodatkiem hydroksyapatytu. Odstępstwem od tej reguły są próbki zawierające 30% HAp, kiedy to następuje spadek zarówno zmiany objętościowej jak i liniowej po wysokości.

## Wnioski

Zastosowany szeroki wachlarz wariantów wytworzonych kompozytów Ti+HAp jak również dobór różnych atmosfer spiekania uzyskanych wyprasek pozwolił na ocenę wpływu tych czynników na uzyskany gotowy kompozyt metaliczno – ceramiczny. Przeprowadzone badania mikrostrukturalne i fazowe przy użyciu analizy rentgenowskiej, umożliwiły określenie składu fazowego uzyskanych kompozytów. Wnikliwa analiza zmian geometrycznych kompozytów pozwoliła na wyciągnięcie daleko idących wniosków dotyczących braku stabilności wymiarowej uzyskanych kompozytów.

pared to the density of the moulded pieces, until it reaches the content of HAp of 40%, when sinter density is higher than the density of a moulded piece.

In the samples annealed in vacuum, the authors observed expansion of the sinter with respect to the moulded piece, whereas the samples annealed in argon atmosphere exhibited contraction.

Both volumetric and linear (height) increments observed in both samples annealed in argon atmosphere and annealed in vacuum increase with concentration of hydroxyapatite. This pattern was exceptionally absent in the samples containing 30% HAp, when a decline in both volumetric changes and linear changes in height is observed.

## Conclusions

A wide variety of variants of Ti+HAp composites obtained in the study and choice of different atmospheres of sintering used for moulded pieces allowed for assessment of the effect of these factors on the metallic-ceramic composites. The microstructural and phase examinations using X-ray analysis allowed for determination of phase composition in the composites obtained. A thorough analysis of geometrical changes in composites helped drawing far-reaching conclusions of the lack of dimensional stability of the composites.

## Piśmiennictwo

- [1] Marciniak J.: Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2002.
- [2] Dudek A.: Microstructure and properties of the composites: hydroxyapatite with addition of zirconia phase, Journal of Engineering Materials and Technology, vol. 133, Iss.2, 2011.
- [3] Dudek A., Nitkiewicz Z.: Structural Analysis of Hydroxyapatite Sinters with Addition of ZrO<sub>2</sub> Phase. Mater. Sci. Forum Vol.638-642, 2010, s.658-663.

## References

- [4] Dudek A, Przerada I.: Kompozyty metaliczno-ceramiczne do zastosowań w medycynie. Mat. Ceramiczne T.62 nr 1, 2010, s.20-23.
- [5] Vaccaro A.R.: "The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft", Orthopedics, 25, (2002), 571- 578.

# USZLACHETNIANIE POWIERZCHNI STOPU TYTANU Ti6Al4V ELI

JUSTYNA KLIMAS\*, AGATA DUDEK, MAGDALENA KLIMAS

POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ MATERIAŁOWEJ I FIZYKI STOSOWANEJ,  
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
AL. ARMII KRAJOWEJ 19, 42 – 200 CZĘSTOCHOWA, POLSKA  
\*MAILTO: JUSTYNAKLIMAS88@GMAIL.COM

## Streszczenie

W ramach pracy próbkę ze stopu tytanu Ti6Al4V ELI poddano procesom utleniania chemicznego, termicznego i elektrochemicznego (anodowego). W celu określenia wpływu różnego rodzaju utleniania na występujące fazy, dokonano badania składu fazowego metodą dyfrakcji rentgenowskiej przed i po procesach utleniania. Ponadto przeprowadzono obserwację mikrostruktur oraz wykonano badania geometrii powierzchni – chropowatości. W wyniku zastosowania utleniania stopu tytanu wytworzono zmodyfikowaną warstwę tlenków o szczególnych, z punktu widzenia zastosowania w medycynie własnościach użytkowych. Z przeprowadzonych badań wynika, że wariant zastosowanego utleniania (chemiczne, termiczne i elektrochemiczne) wpływa na rodzaj uzyskanych faz na powierzchni stopu tytanu. Dodatkowo przeprowadzone badania geometrii powierzchni – chropowatości wykazały, że rodzaj zastosowanego utleniania wpływa na stopień rozwinięcia powierzchni, co ma znaczenie przy stosowaniu tego rodzaju materiałów w implantologii.

**Słowa kluczowe:** biomateriały, utlenianie, stop tytanu, uszlachetnianie powierzchni stopu tytanu  
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 52-54]

## Wprowadzenie

Celem poprawy jednorodności warstewki tlenku tytanu, jak również zwiększenia odporności na oddziaływanie biologiczne środowiska stosuje się procesy uszlachetniające, do których między innymi należy utlenianie chemiczne, termiczne i anodowanie [1,2].

W medycynie stopy tytanu jako biomateriały są stosowane od wielu lat, ze względu na dobrą odporność na korozję, a przede wszystkim zgodność tkankową – nietoksyczność i niewywołanie odczynów alergicznych. Niestety posiadają one również wady: niską odporność na zużycie przez tarcie oraz przechodzenie składników stopu do otaczających wszczep tkankę (tytanoza) [3].

Największym problemem podczas zastosowań implantologicznych jest uzyskanie trwałego połączenia implantu z tkanką kostną, który nie uległby obłuzowaniu po dłuższym okresie użytkowania. Pożądanym jest więc uzyskanie powierzchni o odpowiedniej topografii i bioaktywności umożliwiającej stabilny przyrost tkanki z implantem [4,5].

## Materiały i metody

Próbki badawcze, w kształcie walców o wysokości 5 mm i średnicy 25 mm zostały wycięte z pręta stopu tytanu Ti6Al4V ELI. W pierwszym etapie próbki poddano polerowaniu na półtysk lustrzany, co jest zasadniczym i polecanym zabiegiem obróbki powierzchniowej dla stopów tytanu w implantologii.

# SURFACE REFINEMENT OF TITANIUM ALLOY Ti6Al4V ELI

JUSTYNA KLIMAS\*, AGATA DUDEK, MAGDALENA KLIMAS

CZĘSTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY  
THE FACULTY OF MATERIALS PROCESSING TECHNOLOGY AND  
APPLIED PHYSICS, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
19 ARMII KRAJOWEJ AVE., 42-200 CZĘSTOCHOWA, POLAND  
\*MAILTO: justynaklimas88@gmail.com

## Abstract

*This study presents the results obtained after the processes of chemical, thermal and electrochemical (anode) oxidation of titanium alloy Ti6Al4V ELI. In order to determine the effect of different types of oxidation on individual phases, the authors examined phase composition by means of the method of X-ray diffraction before and after the oxidation processes. Furthermore, the microstructure examinations and surface geometry (roughness) testing were also carried out. Oxidation of titanium alloys caused formation of a modified layer of oxides with specific functional properties that make these materials useful for medical applications. The study showed that the variant of oxidation (chemical, thermal or electrochemical) impacts on the type of phases obtained on titanium surface. The examinations of surface geometry (roughness) demonstrated that the type of oxidation used impacts on the degree of surface development, which is important when using these materials in implantology.*

**Keywords:** biomaterials, oxidation, titanium alloy, surface refinement in titanium alloys  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 52-54]

## Introduction

The refinement processes, such as chemical and thermal oxidation and anodizing, have been used for improvement in homogeneity of titanium oxide layer and for increasing resistance to biological impact of the environment [1,2].

The titanium alloys have been used for years as biomaterials because of their high resistance to corrosion and high biocompatibility (it is non-toxic and does not give allergic reactions). Unfortunately, they also have some disadvantages: low resistance to friction wear and transfer of alloy components to tissues that surround the implant (titanosis) [3].

The major problems when using these materials as implants is obtaining a stable connection between the implant and bone tissue which would not be loosened after a longer period. Therefore, it is desirable to obtain the surface with suitable topography and bioactivity that allow for stable integration of tissues with an implant [4,5].

## Materials and methods

Cylindrical samples with height of 5 mm and 25 mm in diameter were cut out from a bar of titanium alloy Ti6Al4V ELI. At the first stage, the samples were polished until bright finish, which is a typical and recommended surface treatment for titanium alloys used in implantology. The next stage was passivation in 30% solution of HNO<sub>3</sub> acid at room temperature and at the temperature of 60°C, thermal oxidation at temperatures: 400°C, 500°C, 600°C and electrochemical

Próbki zostały poddane: pasywacji w 30% roztworze kwasu  $\text{HNO}_3$  w temperaturze pokojowej oraz w temperaturze 60 °C, utlenianiu termicznemu w temperaturach: 400°C, 500°C, 600°C oraz utlenianiu elektrochemicznemu (anodowaniu) przy następujących parametrach: elektrolit 0,3 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2 pH, 10  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Próbki poddane zostały analizie mikroskopowej, rentgenowskiej analizie jakościowej oraz ocenie topografii powierzchni.

## Wyniki i dyskusja

Próbki poddano badaniom mikrostrukturalnym stosując mikroskop optyczny Axiovert. Otrzymane mikrostruktury przedstawiono na RYS. 1.

Obserwacje mikrostrukturalne warstw tlenkowych przy pomocy mikroskopu świetlnego pozwoliły na stwierdzenie, że im wyższa temperatura utleniania, tym większa ilość tlenków występuje na powierzchni. W przypadku utleniania elektrochemicznego można zauważyć znaczny wzrost ilości tlenków oraz ich większe zagęszczenie.

Wytworzone warstwy tlenkowe poddano rentgenowskiej analizie jakościowej, w celu określenia składu fazowego.

oxidation (anodizing) at the following parameters: electrolyte 0.3 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2 pH, 10  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Microscope X-ray analysis, quality analysis and assessment of surface topography were also carried out.

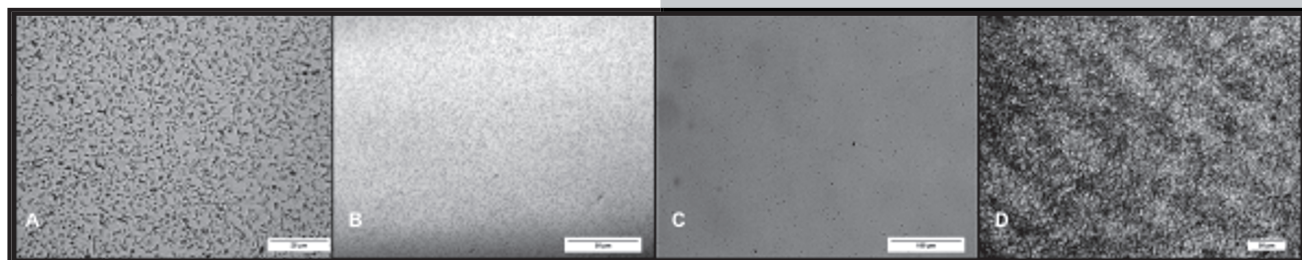
## Results and discussion

The microstructural examinations were carried out by means of Axiovert optical microscope. The microstructures obtained are presented in FIG. 1.

Microstructural examinations of oxide layers using light microscope found that higher oxidation temperatures cause an increase in oxide concentration on the surface. In the case of electrochemical oxidation, a considerable increase in the amount of oxides and its higher concentration can be observed.

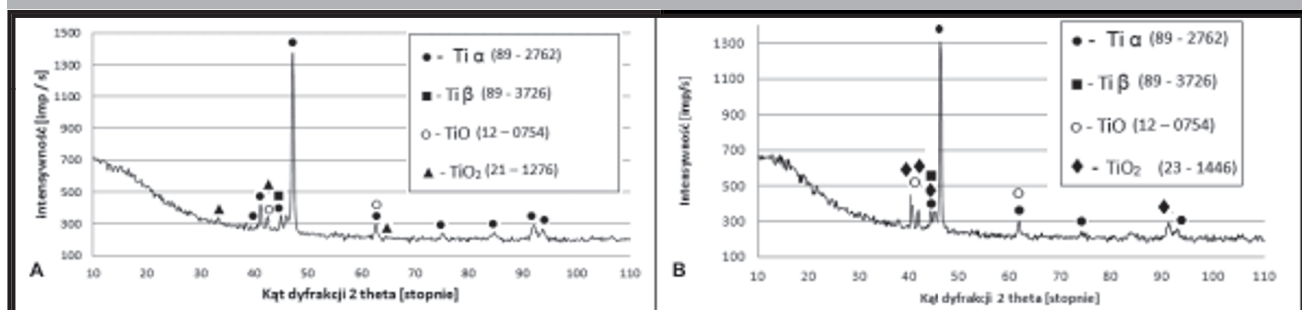
The obtained oxide layers were then analysed by means of X-ray quality analysis in order to determine the phase composition. Graphical representation of X-ray examinations is presented by the diffractograms below.

After oxidation of titanium alloy Ti6Al4V ELI, the authors obtained oxide layers with the following phases: Ti  $\alpha$ , Ti  $\beta$  and oxides: TiO, TiO<sub>2</sub>.



RYS. 1. Mikrostruktura stopu tytanu Ti6Al4V ELI: A) w stanie wyjściowym (polerowana na połysk lustrzany), B) po pasywacji chemicznej w 30% roztworze kwasu  $\text{HNO}_3$  w temperaturze pokojowej, C) po utlenianiu termicznym w temperaturze 500 °C przez 1h, D) po procesie utleniania elektrochemicznego przez 1h przy gęstości prądu 10  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

FIG. 1. Microstructure of titanium alloy Ti6Al4V ELI: A) initial state (bright polish), B) after chemical passivation in 30% solution of  $\text{HNO}_3$  acid at room temperature, C) after thermal oxidation at 500 °C for 1h, D) after electrochemical oxidation for 1h at current density 10  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ .



RYS. 2. Dyfraktogram stopu tytanu Ti6Al4V ELI: A) po pasywacji chemicznej w 30% roztworze kwasu  $\text{HNO}_3$  w temperaturze pokojowej, B) po procesie utleniania elektrochemicznego przy gęstości prądu 10  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

FIG. 2. Diffractogram for titanium alloy Ti6Al4V ELI: A) after chemical passivation in 30% solution of  $\text{HNO}_3$  acid at room temperature, B) after electrochemical oxidation at current density 10  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

TABELA 1. Zestawienie parametru chropowatości  $R_a$  powierzchni próbek.

TABLE 2. Comparison of roughness parameter  $R_a$  on sample surface.

Próbka Sample	Wyjściowa Initial	Utlenianie chemiczne Chemical oxidation		Utlenianie termiczne Thermal oxidation			Utlenianie elektrochemiczne Electrochemical oxidation
		Pasywacja Passivation					
		Temperatura pokojowa Room temperature	60°C	400°C	500°C	600°C	
R <sub>a</sub>	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,027	0,05



Graficzne przedstawienie przeprowadzonych badań rentgenowskich przedstawiają dyfraktogramy.

W wyniku zastosowanego utleniania stopu tytanu Ti6Al4V ELI otrzymano warstwy tlenkowe, składające się z następujących faz: Ti  $\alpha$ , Ti  $\beta$  oraz tlenków: TiO, TiO<sub>2</sub>.

Celem określenia topografii powierzchni oraz jej parametrów przeprowadzono badania z wykorzystaniem profilometru Hommel T1000. Wyznaczenie parametru chropowatości powierzchni  $R_a$  wykonano w kontakcie z badaną powierzchnią przez sprzężenie igły z różnicowym układem pomiarowym. Uzyskane wyniki parametru chropowatości  $R_a$  przedstawiono w TABELI 1.

Analizując średnie arytmetyczne rzędnych profilu  $R_a$ , otrzymane podczas badań geometrii powierzchni można stwierdzić, że najmniejszą chropowatość wykazuje próbka poddana utlenianiu termicznemu przez czas 1h w temperaturze 600°C. Nieznaczna chropowatością odznaczają się również próbki po utlenianiu w temperaturach 400°C i 500°C przez czas 1h, odpowiednio 0,03. Dla próbki utlenianej elektrochemicznie chropowatość wyniosła 0,05.

## Wnioski

Obserwacje mikrostrukturalne warstw tlenkowych przy pomocy mikroskopu świetlnego pozwoliły na analizę morfologii wytworzonych na powierzchni stopu tlenków. Wraz ze wzrostem temperatury utleniania, wzrasta ilość tlenków występujących na powierzchni. W wyniku utleniania elektrochemicznego uzyskano na powierzchni znaczną ilość tlenków o zwartej strukturze.

Badania rentgenowskiej analizy jakościowej pozwoliły na stwierdzenie obecności w badanych próbkach faz tytanu Ti $\alpha$  oraz tytanu Ti $\beta$ . Ujawnione zostały również następujące tlenki: TiO, TiO<sub>2</sub>, charakteryzujące się dużą biogodnością, biokompatybilnością i nietoksycznością dla tkanek ludzkich. Zastosowana obróbka powierzchniowa polegająca na utlenianiu powierzchni stopu Ti6Al4V ELI wpływa na rodzaj oraz ilość powstałych tlenków.

Ocena topografii powierzchni pozwoliła na stwierdzenie, iż wytworzona na powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V ELI warstwa tlenkowa po procesie utleniania elektrochemicznego charakteryzuje się najwyższą chropowatością powierzchni, co z punktu widzenia procesu zespalania implantu z tkankami żywego organizmu jest zjawiskiem niezmiernie korzystnym.

Hommel T1000 roughness tester was used in order to determine surface topography and its parameters. Determination of surface roughness parameter  $R_a$  was carried out in contact with the surface through coupling the indenter with differential measurement system. The obtained results of roughness parameter  $R_a$  are presented in TABLE 1.

Analysis of arithmetic means of  $R_a$  profile ordinates obtained during examinations of surface geometry revealed that the lowest roughness can be found after thermal oxidation for 1h at the temperature 600°C. Insignificant roughness was also found in the samples after oxidation at temperatures 400°C and 500°C for 1h (0.03). The roughness for the sample oxidized electrochemically was 0.05.

## Conclusions

Microstructural examinations of oxide layers by means of the light microscope allowed for the analysis of morphology of the oxides obtained on the surface of the alloy. The increase in oxidation temperature causes an increase in the amount of oxides present on the surface. A considerable amount of oxides with compact structure was obtained on the surface after electrochemical oxidation.

The X-ray quality analysis revealed presence of titanium phases Ti $\alpha$  and Ti $\beta$  in the samples studied. The oxides TiO, TiO<sub>2</sub> were also found. They are characterized by high biocompatibility and non-toxicity for human tissues. The surface treatment, which consisted in oxidation of the surface of titanium alloy Ti6Al4V ELI, impacts on the type and amount of oxides.

Surface topography analysis found that the oxide layer created on the surface of titanium alloy Ti6Al4V ELI after the process of electrochemical oxidation is characterized by the highest surface roughness, which from the standpoint of the process of integration of an implant with living tissues is a very advantageous phenomenon.

## Piśmiennictwo

- [1] Ossowska A.: Uzyskiwanie cienkich warstw anodowych na tytanie i jego stopach, Gdańsk 2009.
- [2] Van Gilss Mast P., Stijns E., Terren H.: Colour properties of barrier anodic oxide films on aluminium and titanium studied with total reflectance and spectroscopic ellipsometry. *Surface & Coatings Technology* 185 (2 – 30)(2004) 303 – 310.
- [3] Wierzchoń T., Czarnowska E., Maranda – Niedbała A., Zagato – Mylik M.: Obróbki jarzeniowe tytanu i jego stopów w aspekcie zastosowań w medycynie, *Inżynieria Materiałowa*, 2 (1999) 57-61.

## References

- [4] Marciniak J.: Zagadnienia optymalizacji i strategii rozwoju biomateriałów dla chirurgii kostnej, *Inżynieria Materiałowa* 4, (1991) 94-97.
- [5] Kusz D.: Biomechaniczne aspekty endoprotezoplastyk stawu biodrowego, *Inżynieria Materiałowa* 2 (1997) 39-43.

# ZŁOŻONY UKŁAD WOLNYCH RODNIKÓW W STERYLIZOWANYCH TERMICZNIE LEKACH GLIKOKORTYKOSTEROIDOWYCH

MAGDALENA KOŚCIELNIAK<sup>1,2\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC

<sup>2</sup>FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, PRACOWNIA SZTUCZNEGO SERCA,

UL. WOLNOŚCI 345A, 41-800 ZABRZE

\*MAILTO: MKOSCIELNIAK\_ZIEMNIAK@FRK.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 55-56]

## Wprowadzenie

Opracowano metodę badań spektroskopowych złożonego układu wolnych rodników powstających w wybranych lekach glikokortykosteroidowych podczas sterylizacji termicznej. Glikokortykosteroidy są sklasyfikowane według rodzaju czynnej chemicznej substancji lub drogi podania [1,2]. Są stosowane w leczeniu konkretnej choroby przeciwzapalnie, immunosupresyjnie lub przeciwozłuszczeniowo. Glikokortykosteroidy są jednymi z kortykosteroidów (sterydy kory nadnerczy) uwalnianych z nadnerczy. Fizjologicznym bodźcem pobudzającym wydalenie glikokortykosteroidów jest kortykotropina z przedniego płata przysadki [1,2]. Glikokortykosteroidy są syntetyzowane i uwalniane w miarę potrzeb. Glikokortykosteroidy, np. kortyzol i kortyzon, są niezbędne dla wykorzystania węglowodanów, tłuszczów i białek przez organizm, a do prawidłowej odpowiedzi na stres [1,2]. Spośród leków glikokortykosteroidowych do badań wybrano deksametazon, prednizolon i acetonid flucinolonu. Struktura chemiczna testowanych leków jest pokazana na RYSUNKU 1 [3].

## Materialy i metody

Leki sterylizowano termicznie suchym gorącym powietrzem zgodnie z wymogami farmakopealnymi [4] w następujących temperaturach (T) i czasach ogrzewania (t): a)

T=160 °C, t=120 minut; b) T=170 °C, t=60 minut; c) a) T=180 °C, t=30 minut. Sterylizację wykonano w suszarkę z termoobiegiem z wykorzystaniem wskaźników termicznych i biologicznych dla kontroli parametrów i skuteczności procesu. Suszarkę z taśmą TGP (Special Tapes) i wskaźnikami Spore Strip z zarodnikami *Bacillus atrophaeus* (RAVEN LABSS) umieszczonymi wewnątrz sterylizatora, pomiędzy lekami przedstawiono na RYSUNKU 2.

Próbki leków w postaci proszku umieszczono w cienkościennych rurkach szklanych o średnicy wewnętrznej 3

# COMPLEX FREE RADICALS SYSTEM IN THERMALLY STERILIZED GLUCOCORTICOSTEROIDES

MAGDALENA KOŚCIELNIAK<sup>1,2\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE, 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup>THE ZBIGNIEW RELIGA FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT,

345A WOLNOŚCI STR., 41-800 ZABRZE, POLAND

\*MAILTO: MKOSCIELNIAK\_ZIEMNIAK@INTERIA.PL

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 55-56]

## Introduction

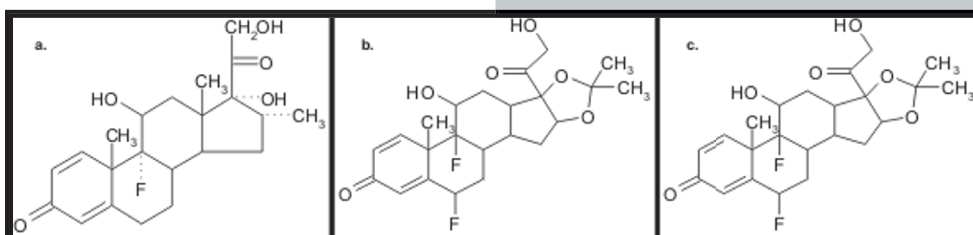
The method of spectroscopic studies of complex system of free radicals formed in the glucocorticosteroids during thermal sterilization was proposed. Glucocorticosteroid drugs are classified by the chemical type of the active ingredient or by the way [1,2]. Drugs are used to treat a particular condition as a anti-inflammatory, immunosuppressive or anti-swelling. Glucocorticosteroids are one of the corticosteroids (adrenal cortical steroids) released from the adrenal gland. The physiological stimulus for glucocorticosteroids release is corticotropin from the anterior pituitary [1,2]. Glucocorticosteroids are synthesized and released as needed. Glucocorticosteroids e.g. cortisol and cortisone, are essential for the utilization of carbohydrate, fat and protein by the body and for normal response to stress [1,2]. The dexamethasone, prednisolone nad flucinolone acetone drugs from the glucocorticosteroids group were chosen to examination. Chemical structure of these drugs is presented in FIGURE 1 [3].

## Materials and method

The drugs were sterilized at dry hot air according to the Farmakopea Norms [4] at the following temperatures (T) and heating times (t): a) T=160 °C, t=120 minutes; b) T=170 °C, t=60 minutes; c) a) T=180 °C,

t=30 minutes. Sterilization was performed in hot air oven with air circulation, and the thermal and biological control factors were used. The oven with these control factors TGP (Special Tapes) and indicators Spore Strip with bacterial *Bacillus atrophaeus* is presented in FIGURE 2.

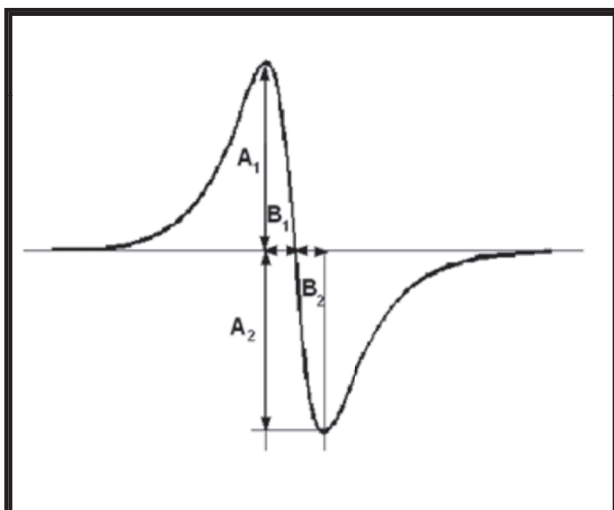
The powdered drug samples were placed in thin walled Glass tubes with the inner diameter of 3 mm. For the tested drugs the first derivative electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were measured by the spectrometer of Radiopan Firm (Poznań). The measurements were done by the



RYS. 1. Struktura chemiczna leków a) deksametazonu, b) prednizolonu, c) acetonidu gflucinolonu [3].

FIG. 1. Chemical structure of a) dexamethasone, b) prednisolone, c) flucinolone acetone [3].

mm. Dla badanych leków rejestrowano widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) Firmy Radiopan (Poznań) w postaci pierwszej pochodnej. Pomiary wykonano z wykorzystaniem spektrometru EPR na pasmo X o częstotliwości promieniowania mikrofalowego wynoszącej 9.3 GHz współpracującego z układem numerycznej rejestracji Rapid Scan Unit Firmy Jagmar (Kraków). Zastosowano modulację pola magnetycznego 100 kHz. Całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron wynosiła 70 mW. Zmieniano tłumienie i uzyskano moce mikrofalowe z zakresu 2.2-70 mW. Dla widm EPR analizowano następujące parametry kształtu:  $A_1/A_2$ ,  $A_1-A_2$ ,  $B_1/B_2$ ,  $B_1-B_2$ . Wielkości  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  pokazano na RYSUNKU 3.



RYS. 3. Parametry  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  stosowane do analizy kształtu widm EPR.

FIG. 3.  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  parameters used to shape analysis of EPR spectra.

## Wyniki i dyskusja

Stwierdzono zależność parametrów kształtu widm EPR od mocy mikrofalowej, RYS.4. Efekt ten jest charakterystyczny dla próbek ze złożonym układem wolnych rodników [5].

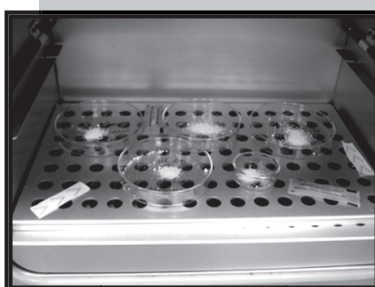
Wypadkowe widmo EPR leku zmienia kształt wraz z mocą, ponieważ każda linia składowa zmienia się wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej w inny sposób. Proponowana metoda może być stosowana również dla próbek biologicznych oraz biomateriałów, w których często występuje kilka rodzajów wolnych rodników.

## Podziękowania

Badania finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach z umowy nr KNW-1-002/P/210 i przez Fundację Rozwoju Kardiologii.

## Piśmiennictwo

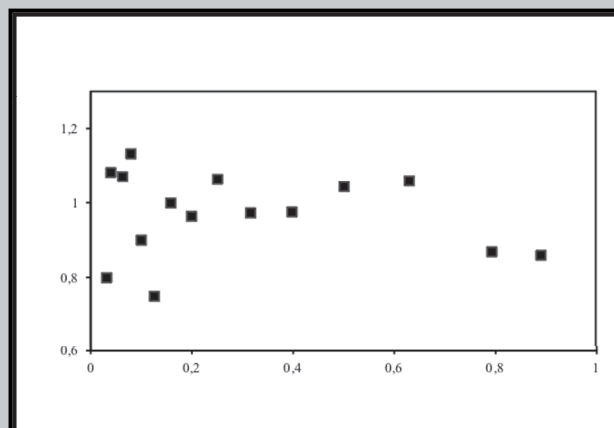
- [1] Jung L, Skorupski M, Mazurkiewicz M, Skopińska-Różewska E. Glucocorticoid in the treatment of joint surgery. *Centr Eur J Immunol* 2008; 33: 153-157.
- [2] Alves C, Robazzi TC, Mendonça M. Withdrawal from glucocorticoid therapy: clinical practice recommendations. *J Pediatr* 2008; 84: 192-202.



RYS. 2. Suszarka do sterylizacji termicznej z wskaźnikami fizycznymi i biologicznymi.

FIG. 2. The hot oven with the physical and biological control factors.

use of an X-band EPR spectrometer with microwaves of 9.3 GHz frequency and the numerical detection system Rapid Scan Unit of Jagmar Firm (Kraków). The modulation of magnetic field was 100 kHz. The total microwave Power produced by klystron was 70 mW. The attenuation was changed and the microwave power in the range 2.2-70 mW were obtained. For the EPR spectra the following parameters of shape were analysed:  $A_1/A_2$ ,  $A_1-A_2$ ,  $B_1/B_2$ ,  $B_1-B_2$ . The values of  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  are shown in FIGURE 3.



RYS. 4. Zależność parametru  $A_1/A_2$  widma EPR acetonidu flucinolonu sterylizowanego termicznie w temperaturze 180°C przez 30 minut od mocy mikrofalowej.

FIG. 4. The influence of microwave power  $A_1$  and  $A_2$  parameters of EPR spectra flucinolone acetamide thermally sterilized at 180°C by 30 minutes.

## Results and discussion

It was stated that all the tested parameters of lineshape of EPR spectra depend on microwave power (FIG.4). This effect is characteristic for samples with complex system of free radicals [5].

## Acknowledgements

This study was supported by Medical University of Silesia in Katowice, partially by grant no KNW-1-002/P/210, and Foundation of Cardiac Surgery Development in Zabrze.

## References

- [3] Janiec W, red. Kompendium farmakologii. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2005.
- [4] Farmakopea Polska VIII. Warszawa: PTFarm; 2009.
- [5] Wertz JE, Bolton JR. Electron Spin Resonance. New York, London: Elementary Theory and Practical Applications; 1986.



## BADANIA BIOZGODNOŚCI IN VITRO POLIMERÓW KONSTRUKCYJNYCH POMPY WSPOMAGANIA SERCA RELIGA HEART EXT, PODDANYCH PROCESOWI PRZETWÓRSTWA

MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK<sup>1\*</sup>, PIOTR WILCZEK<sup>2</sup>,  
ROMAN KUSTOSZ<sup>1</sup>, MAŁGORZATA GONSIOR<sup>1</sup>

FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,  
UL. WOLNOŚCI 345A, 41-800 ZABRZE, POLSKA

<sup>1</sup>PRACOWNIA SZTUCZNEGO SERCA

<sup>2</sup>PRACOWNIA BIOINŻYNIERII

\*MAILTO: MKOSCIELNIAK\_ZIEMNIAK@FRK.PL

### Streszczenie

Celem badań była ocena biouzgodności w testach *in vitro* polimerów konstrukcyjnych polskiej pozaustrojowej pulsacyjnej pompy wspomaganie serca Religa Heart EXT. Badaniu poddano próbki polimerów Bionate® II 90A, Bionate® II 55D i ChronoFlex® AR-LT przygotowane po procesach przetwórstwa, odpowiadających wytworzeniu pompy Religa Heart EXT. Przedmiotem badań była ocena oddziaływania polimerów na wybrane elementy komórkowe, takie jak: erythrocyty, płytki krwi i fibroblasty. Przeprowadzono testy hemolizy, trombogenności, cytotoksyczności oraz struktury chemicznej polimerów. Badania wykonano zgodnie z polską normą PN-EN ISO 10993. Rezultaty wykazały, że polimery konstrukcyjne po przetwórstwie nie oddziaływały negatywnie na elementy morfotyczne krwi, nie aktywowały płytek krwi i leukocytów oraz nie oddziaływały toksycznie na komórki fibroblastów. Ponadto, nie stwierdzono istotnych zmian w strukturze chemicznej polimerów konstrukcyjnych po procesie przetwórstwa technologicznego.

**Słowa kluczowe:** biouzgodność, poliwęglan uretanowy PCU, pulsacyjne pompy wspomaganie serca.

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 57-61]

### Wprowadzenie

Biomateriały konstrukcyjne wyrobów medycznych przeznaczonych do długoterminowego kontaktu z krwią, takich jak urządzenia wspomagające pracę serca, muszą oznaczać się najwyższą klasą biouzgodności. Powierzchnia biomateriału protezy serca kontaktując się z krwią i okolicznymi tkankami wpływa bezpośrednio na elementy morfotyczne krwi i sąsiadujące tkanki oraz pośrednio na pozostałe tkanki i narządy organizmu. Dlatego brak biouzgodności biomateriału może prowadzić do negatywnych ogólnoustrojowych reakcji organizmu. W programie „Polskie Sztuczne Serce” opracowano nową konstrukcję polskiej pozaustrojowej pulsacyjnej pompy wspomaganie serca Religa Heart EXT, przeznaczonej do wspomaganie serca przez okres kilku miesięcy [1]. Elementy konstrukcyjne pompy są zbudowane z nowoczesnych biouzgodnych poliuretanów poliwęglanowych. Polimery te podczas wytwarzania pompy poddawane są procesom przetwórstwa technologicznego metodą wtrysku wysokociśnieniowego lub metodą laminowania z roztworu. Istotny etap opracowania konstrukcji i technologii wytwarzania wyrobu medycznego stanowią badania biologiczne oceny jego biouzgodności. Wytyczne dotyczące doboru ba-

## BIOCOMPATIBILITY IN VITRO INVESTIGATIONS OF RELIGA HEART EXT VENTRICULAR ASSIST DEVICE STRUCTURAL POLYMERS, TREATED WITH TECHNOLOGICAL PROCESS

MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK<sup>1\*</sup>, PIOTR WILCZEK<sup>2</sup>,  
ROMAN KUSTOSZ<sup>1</sup>, MAŁGORZATA GONSIOR<sup>1</sup>

FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT,  
345A WOLNOŚCI STR., 41-800 ZABRZE, POLAND

<sup>1</sup>ARTIFICIAL HEART LABORATORY,

<sup>2</sup>BIOENGINEERING LABORATORY

\*MAILTO: MKOSCIELNIAK\_ZIEMNIAK@FRK.PL

### Abstract

The aim of the investigations was *in vitro* biocompatibility evaluation of Polish extracorporeal pulsatile ventricular assist device Religa Heart EXT structural polymers. Samples of polymers: Bionate® II 90A, Bionate® 55D and ChronoFlex® AR-LT were tested, had been treated before with technological processes matching the conditions of Religa Heart EXT pump manufacturing. The subject of the investigation was the interaction between polymers and cellular elements (erythrocytes, platelets and fibroblasts). The following tests were performed: haemolysis, thrombogenicity, cytotoxicity and chemical structure analyses. The tests were performed according to Polish standard PN-EN ISO 10993. The results revealed: no negative interaction between blood cells and structural polymers, after technological process; no activation of platelets and leukocytes, and no fibroblasts toxicity. Furthermore, no essential changes in the chemical structure of the examined polymers after technological process were observed.

**Keywords:** biocompatibility, PCU polycarbonate-urethane, pulsatile ventricular assist device.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 57-61]

### Introduction

Structural biomaterials of medical devices designed for long-term contact with blood, such as heart assist devices, must be characterized by the highest class of biocompatibility. The biomaterial surface of heart prosthesis, contacting with blood and local tissues, influences directly on blood cells and surrounding tissues, as well as indirectly on the rest of human body tissues and organs. Therefore the lack of biomaterials biocompatibility can lead to negative systemic reactions. Within the “Polish Artificial Heart” project a new construction of Polish extracorporeal pulsatile ventricular assist device (Religa Heart EXT) was developed, dedicated to long term heart assistance for several months [1]. The structural pump elements are built with high-tech biocompatible polycarbonate polymers. The polymers are treated with technological processes (including: high-pressure injection either solution dipping), during pump manufacturing. The essential part of medical device construction and manufacturing process development are the biological tests of biocompatibility evaluation. Directives concerning tests selection and tests methods are described in Polish standard PN-EN ISO 10993-1-18. the new heart assist de-

dań oraz metodyki ich prowadzenia określa polska norma PN-EN ISO 10993-1-18. Przed przystąpieniem do badań in vivo oraz wprowadzeniem nowej pompy wspomaganie serca do praktyki klinicznej niezbędne jest wykonanie badań in vitro potwierdzających dobre właściwości biologiczne materiałów konstrukcyjnych nowego wyrobu medycznego. Celem przeprowadzonych badań in vitro była ocena właściwości biologicznych i chemicznych polimerów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT po ich przetwórstwie.

## Materialy i metody

Próbki do badań przygotowano zgodnie z wymogami określonymi dla zastosowanej techniki badawczej oraz w sposób reprezentatywny dla gotowego wyrobu medycznego. Próbkę polimerów po przetwórstwie wykrojono z gotowych elementów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT. Materiał badawczy kolejno płukano w wodzie destylowanej, suszono i wyjałowiono tlenkiem etylenu [2].

Badania hemolizy wykonano metodą bezpośrednią [2-3]. Krew poddawano oddziaływaniu polimerów konstrukcyjnych na specjalnym stanowisku badawczym, składającym się z ciepłarki i rolkowego mieszadła hematologicznego. Badane polimery kontaktowano ze świeżą krwią ludzką konserwowaną CPDA. Celem nasilenia zjawisk oddziaływania polimeru na krew, próbki krwi z badanymi materiałami inkubowano w ciepłarnie, w podwyższonej temperaturze (37°C) przez okres 8 i 24 godzin.

Badania wpływu polimerów konstrukcyjnych na płytki krwi przeprowadzono z użyciem analizatora Impact-R [2,4]. Badane polimery kontaktowano z krwią ludzką w warunkach oddziaływania sił ścinających. Krew po kontakcie z powierzchnią badanych biomateriałów w teście Impact-R badano metodą cytometrii przepływowej. Powierzchnię badanych polimerów po kontakcie z krwią oceniano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego. Aktywność i agregację leukocytów oraz płytek krwi oceniano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych CD 45 (leukocyty) i CD 62 (P selektyna płytek krwi).

Badania cytotoksyczności polimerów wykonano metodą bezpośrednią. W testach cytotoksyczności badane polimery poddano 24 godzinnemu kontaktowi z fibroblastami mysimi. Następnie fibroblasty barwiono jodkiem propidyny i zliczano w mikroskopie fluorescencyjnym [2].

Badaniu składu chemicznego poddano dwa biomateriały: Bionate® II 90A oraz Bionate® II 55D. Polimery poddano analizie w postaci surowców (przed procesem przetwórstwa) oraz w postaci fragmentów z elementów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT, pozyskanych jako próbki materiału po przetwórstwie [2]. Wykonano analizy: magnetycznego rezonansu jądrowego NMR, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera FTIR, różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC oraz chromatografii żelowej GPC. Celem badań było zidentyfikowanie zmian w strukturze chemicznej polimerów, wywołanych procesem przetwórstwa.

## Wyniki i dyskusja

Rezultaty badań hemolizy - potwierdzają, że polimery konstrukcyjne po przetwórstwie: Bionate® II 90A, Bionate® II 55D oraz ChronoFlex® AR-LT, badane w kontakcie z pełną krwią ludzką, nie wywołują działania hemolitycznego, nie zmieniają obrazu morfologicznego erytrocytów oraz nie wpływają istotnie na wartości parametrów układu czerwono krwinkowego, TABELA 1. Stopień hemolizy określono na podstawie normy ASTM F 756 - 00 [3].

Badane polimery po przetwórstwie nie wykazywały istotnych cech trombogennych i aktywacji układu płytko-

vice, It is necessary, to perform the in vitro examinations, to confirm the good biological properties of new medical device structural materials, before beginning of in vitro tests and introducing the device to clinical trials. The aim of performed in vitro examinations was the evaluation of biological and chemical properties of Religa Heart EXT pump structural polymers, treated with technological process.

## Material and methods

Samples for tests were prepared according to certain requirements of applied tests technique. It were prepared in the way representative for final medical device manufacturing. The samples of polymers treated with technological process were cut out from routinely produced constructional elements of Religa Heart EXT pump. Material samples were washed in distilled water, dried, and sterilized with ethylene oxide, respectively [2].

Haemolysis tests were performed applying the direct method [2-3]. The interaction between the structural polymers and blood was evaluated on the special experimental stand, consisted of an incubator and roller haemolytic mixer. Tested polymers were contacted with fresh human blood, preserved with CPDA. In order to intensify the phenomena of polymers and blood interaction, the test-tubes filled in blood and tested materials were incubated in the increased temperature (37°C) for period of 8 and 24 hours.

The examination of the polymers influence on blood platelets was performed utilizing Impact-R analyser [2,4]. Tested polymers were contacted with fresh human blood in shear stress conditions. The blood, after contact with tested polymers surface during the Impact-R test, was examined applying flow cytometry. The surface of tested polymers after contact with blood was analyzed utilizing fluorescent microscope. The activity and aggregation of leukocytes and platelets were evaluated utilizing monoclonal antibodies CD 45 (leukocytes) and CD 62 (blood platelets P-selectin).

Cytotoxicity tests were performed applying the direct method. The investigated polymers as the raw materials (before technological process) were exposed to mice fibroblasts. Then fibroblast were stained with propidium iodide and counted utilizing fluorescent microscope [2].

The chemical characteristic of two biomaterials: Bionate® II 90A and Bionate® II 55D were tested. The polymers were analyzed in form of raw material (before technological process) and in form of Religa Heart EXT structural element parts, obtained as small material samples, after technological process. The following analyses were done: nuclear magnetic resonance NMR, Fourier transform infrared spectroscopy FTIR, differential scanning calorimetry DSC and gel permeation chromatography GPC.

## Results and discussion

Results of haemolysis tests indicate, that the investigated structural polymers: Bionate®II 90A, Bionate®II 55D and Chronoflex® AR-LT, examined in the contact with human blood, did not cause haemolytic effects, did not affect erythrocyte morphology and did not significantly influence on red cells system parameters, TABLE 1. Haemolysis degree was determinate on the basis of standard ASTM F756-00 [3].

The investigated polymers treated with technological process did not present significant thrombogenicity properties or platelet-leukocyte system activation (in the receptors systems: platelet CD 62P and leukocyte CD 45), FIGs. 1 a and b. The examination was carried on standing blood (not exposed to shear-stress conditions - blank), and on blood exposed to shear-stress conditions - caused by reference ma-

wo-leukocyta-  
nego (w ukła-  
dach recepto-  
rowych: CD62P  
płytkowym i  
CD45 leukocy-  
tarnym), RYS.1  
a i b. Badania  
przeprowadzo-  
no dla krwi wol-  
nostojącej, nie  
poddanej eks-  
pozycji do na-  
prężen ścinają-  
cych - próba śle-  
pa oraz dla krwi  
poddanej ekspo-

zycji do naprężeń ścinających wywołanych przez materiał re-  
ferencyjny - polistyren oraz badane biomateriały, RYS. 1 a i b.

Badania cytotoxyczności wykazały, że badane polimery  
konstrukcyjne po przetwórstwie: Bionate® II 90A, Bionate®  
II 55 D i ChronoFlex® AR-LT nie są cytotoksyczne. Ilość  
komórek nekrotycznych była niska i mieściła się w prze-  
dziale od 7 do 105 komórek w polu badania, RYS. 2. Ko-  
mórki żywe cechowały się prawidłową morfologią, RYS. 3.

Struktura chemiczna materiału Bionate® II 90A i Biona-  
te® II 55D, badanych  
w postaci surowca wyj-  
ściowego i po przetwórstwie,  
nie wykazała żąd-  
nych zmian pod wzglę-  
dem grup funkcyjnych,  
składu pierwiastkowego  
i rodzaju występujących  
wiązań chemicznych,  
RYS. 4. Różnice wystą-  
piły w strukturze bada-  
nego związku. Polime-  
ry konstrukcyjne przed  
procesem przetwórstwa  
były częściowo (w nie-  
wielkim stopniu) krystal-  
iczne (uporządkowane).  
Najmniej krystaliczny  
(uporządkowany) był  
materiał Bionate® II 90A  
po przetwórstwie. Próbk  
surowców wyjściowych  
charakteryzowały się  
niższymi temperaturami  
zeszklenia niż próbki po  
przetwórstwie. Polimer  
Bionate® II 90A przed i  
po przetwórstwie łatwo  
krystalizował, w przeci-  
wieństwie do materiału  
Bionate® II 55D.

Polimery Bionate® II  
90A i Bionate® II 55D  
przed i po przetwórstwie  
różniły się dystry-  
bucją wiązań wodoro-  
wych, również na po-  
wierzchni. Po przetwórstwie  
zmniejszyła się masa  
molowa i dyspersja (Mw/Mn)  
w porównaniu do polimerów  
wyjściowych obu rodzajów

Materiał badany Tested material	Czas eksperymentu Experiment duration [h]	Indeks hemolityczny Haemolysis Index [%]	Stopień hemolizy Haemolytic Grade
Bionate® II 90A	8	0,08%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
Bionate® II 55D	8	0,11%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
ChronoFlex® AR-LT	8	0,20%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
Bionate® II 90A	24	0,16%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
Bionate® II 55D	24	0,04%	Niehemolityczny / nonhaemolytic
ChronoFlex® AR-LT	24	0,03%	Niehemolityczny / nonhaemolytic

**TABELA 1. Zestawienie indeksu hemolitycznego i stopnia hemolizy dla badanych biomateriałów [3].**

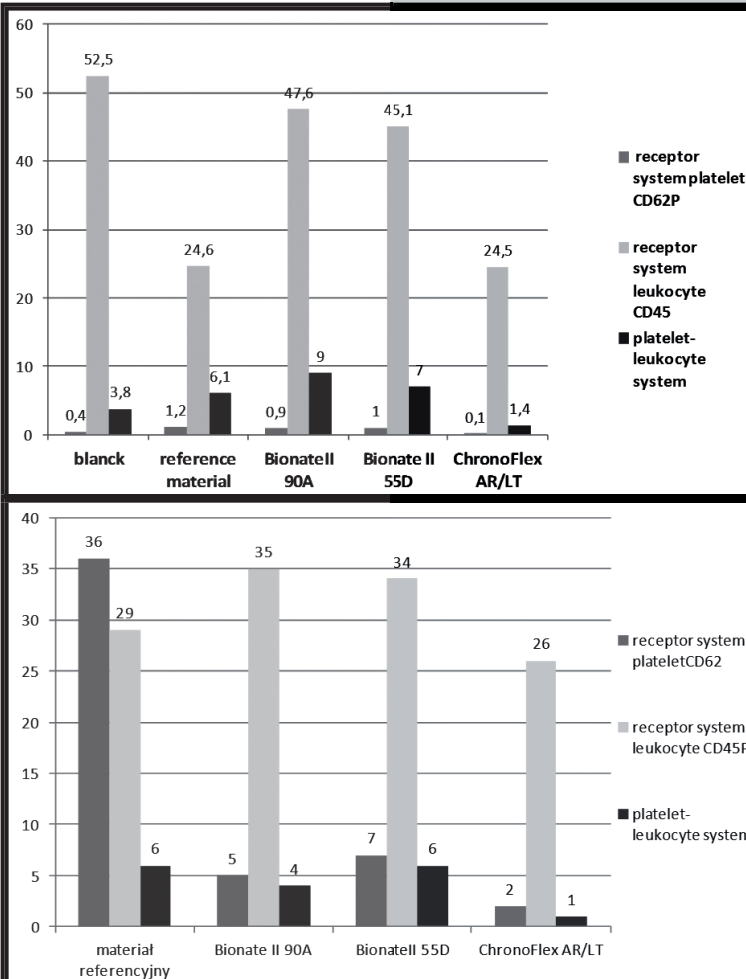
**TABLE 1. Haemolysis Index and haemolytic grade for tested biomaterials [3].**

nological process, are not cytotoxic. The number of necrotic  
cells was low, and observed in the range from 7 to 105 cells  
on the examination field area, FIG.2. The vivid cells were  
characterized by proper morphology, FIG.3.

The chemical structure of materials (Bionate® II 90A  
and Bionate® II 55D), tested as a raw material as well as  
material after technological process, did not change, in  
terms of functional groups, elemental composition, and types  
of existing chemical bonds, FIG.4. The differences of the

polymers structure were  
observed. The structural  
polymers before techno-  
logical process were par-  
tially (in a small degree)  
crystalline (organized).  
Bionate®II 90A after tech-  
nological process was the  
least crystalline material.  
Samples of raw materi-  
als were characterized by  
lower glass transition tem-  
perature, comparing to  
samples of materials after  
technological process.  
The Bionate®II 90A  
polymer before and after  
technological process  
crystallized easily, oppo-  
site to the polymer  
Bionate®II 55D.

Polymers (Bionate®II  
90A and Bionate®II 55D)  
before and after techno-  
logical process varied in  
the distribution of hydro-  
gen bonds, on the poly-  
mer surface, as well.  
After technological pro-  
cess the molar mass and  
dispersion (Mw/Mn) de-  
creased, in comparison  
to raw polymers of both  
types. The observed dif-  
ferences were insignifi-  
cant, however to confirm  
these effects additional  
polymer tests of strength  
and elasticity properties  
should be performed.



**RYS. 1. Wartości median komórek CD62P, CD45 oraz agregatów leukocyta-  
płytkowych po kontakcie z badanymi polimerami konstrukcyjnymi a) w cytometrii przepływowej, b) w mikrosko-  
pie fluorescencyjnym.**

**FIG. 1. Media values of CD62P, CD45 cells and platelet-leukocyte  
aggregates after contact with the investigated structural poly-  
mers, a) flow cytometry, b) fluorescence microscope.**



badanych polimerów. Obserwowane różnice były niewielkie, jednak celem potwierdzenia zmian, planowane jest wykonanie dodatkowych badań własności wytrzymałościowych i sprężystych polimerów.

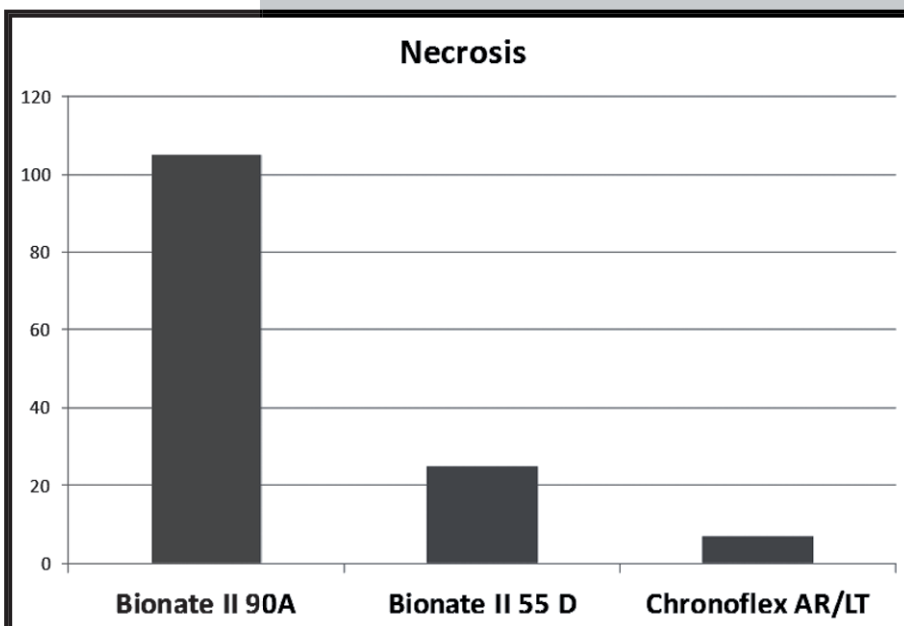
## Wnioski

Przeprowadzone badania biologiczne biomateriałów, zgodnie z polską normą PN-EN ISO 10993 wykazały, że badane polimery konstrukcyjne po przetwórstwie nie oddziaływały negatywnie na elementy morfotyczne krwi, nie aktywowały w kontakcie powierzchniowym płytek krwi i leukocytów, nie powodowały cytotoksyczności komórek. Ponadto, nie stwierdzono istotnych zmian w strukturze chemicznej polimerów konstrukcyjnych przed i po procesie przetwórstwa technologicznego. Celem pełnego potwierdzenia własności biologicznych polimerów konstrukcyjnych pompy Religa Heart EXT zostaną przeprowadzone badania reakcji zapalnej i uczuleniowej oraz badania toksyczności in vivo, w doświadczeniach na zwierzętach.



**RYS. 3. Ocena mikroskopowa badanych polimerów w teście cytotoksyczności bezpośredniej. Obraz mikroskopowy komórek żywych dla AR-LT, B II 55D i B II 90A.**

**FIG. 3. Microscopic assessment of the investigated discs in direct cytotoxicity test. Microscopic image of vivid cells for Chronoflex® AR-LT, Bionate® II 55D and 90A.**

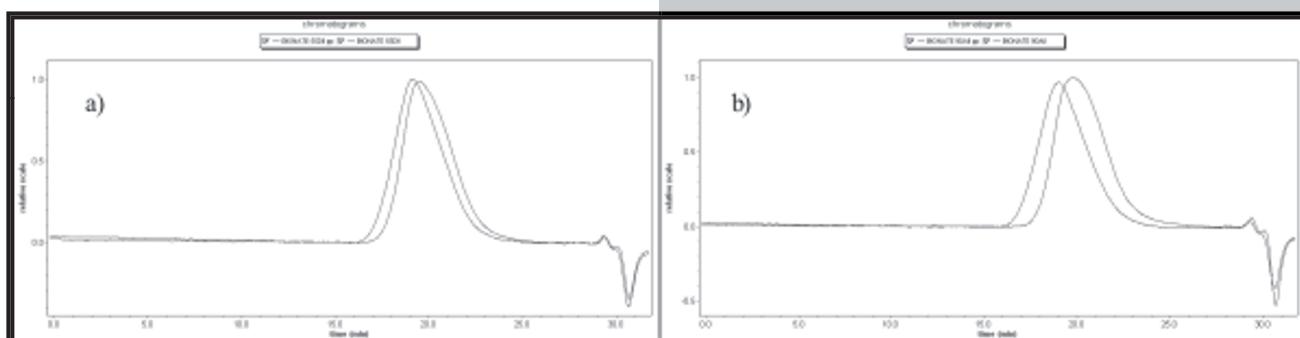


**RYS. 2. Wartości bezwzględne liczby komórek nekrotycznych w teście cytotoksyczności bezpośredniej.**

**FIG. 2. Absolute values of necrotic cells in direct cytotoxicity test.**

## Conclusions

The performed biological tests of biomaterials, according to Polish Standard PN- EN 10993, proved that the investigated structural polymers did not influence negatively on the blood elements, did not activate the platelets and leukocytes in the surface contact, did not cause the cell cytotoxicity, being treated with technological process. Moreover, no significant changes in the polymers chemical structure were found, before and after technological process. In order to confirm completely the biocompatibility properties of Religa Heart EXT structural polymers, the inflammatory and allergic reaction in vivo tests as well as in vivo toxicity tests will be carried out.



**RYS. 4. Porównanie sygnałów IR poliuretanów a) przed i po przetwórstwie (b).**

**FIG. 4. Comparison of polyurethane IR signals a) before and b) after technological processing.**

## Podziękowania

Praca była realizowana w ramach wieloletniego projektu strategicznego na lata 2007-2012 pod nazwą „Polskie Sztuczne Serce”.

## Acknowledgements

The research were performed within the long-term strategic project for the period 2007-2012 called “Polish Artificial Heart”.

## Piśmiennictwo

- [1] Blood pump in particular a pneumatic ventricular assist device EP 11183484.2 30.09.2011.
- [2] PN EN ISO 10993- Badania biogodności wyrobów medycznych, część 1, 4-5, 13.
- [3] ASTM F 756-00. Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials. 2005.

## References

- [4] A. Morrison, V. S. Hornsey, C. V. Prowse, I. R. MacGregor. Use of the DiaMed Impact R to test platelet function in stored platelet concentrates. Article first published online: 2 JUN 2007, DOI: 10.1111/j.1423-0410.2007.00938.x. Volume 93, Issue 2, pages 166–172, August 2007].

## NAPEŁNIACZE WSPOMAGAJĄCE PROCES FOTO-BIO-DEGRADACJI MEDYCZNYCH ODPADÓW POLIMEROWYCH

ANNA SOBCZYK-GUZENDA<sup>1\*</sup>, MARIUSZ KACZMAREK<sup>2</sup>,  
JUSTYNA GRZYWACZ<sup>1</sup>, HIERONIM SZYMANOWSKI<sup>1</sup>,  
MACIEJ GAZICKI-LIPMAN<sup>1</sup>, BOGUSŁAW WOŹNIAK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA

<sup>2</sup>ŁÓDZKA AGENCJA ROZWOJU REGIONALNEGO,  
UL. TUWIMA 22/26, 90-002 ŁÓDŹ, POLSKA

<sup>3</sup>INSTYTUT PRZEMYSŁU SKÓRZANEGO,  
UL. ZGIERSKA 73, 91-462 ŁÓDŹ, POLSKA

\*MAILTO: ANNA.SOBCZYK-GUZENDA@P.LODZ.PL

### Streszczenie

W niniejszej pracy został omówiony sposób plazmo-chemicznej modyfikacji napelniczy do foto-bio-degradowalnych materiałów kompozytowych. W tych materiałach polimer syntetyczny będzie stanowił matrycę, natomiast napelniczami będą polimer naturalny (skrobia) oraz ditlenek tytanu ( $\text{TiO}_2$ ), które mają za zadanie znacznie przyspieszyć proces degradacji matrycy. Ponadto założono, że w okresie użytkowania taki kompozyt będzie wykazywał właściwości fotokatalityczne wzbudzone światłem z zakresu UV-B. W pracy został opisany wpływ modyfikacji powierzchniowej napelniczy na ich właściwości fizyko-chemiczne. Do oceny zwilżalności skrobi wykorzystano zjawisko kapilarnego wniesienia wody. W celu określenia zmian stopnia usieciowienia została wykonana analiza spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).

**Słowa kluczowe:** metoda RF PECVD, modyfikacja powierzchniowa napelniczy, fotodegradacja, biodegradacja, materiały kompozytowe  
*Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 62-65*

### Wprowadzenie

W Polsce w porównaniu do najbardziej rozwiniętych krajów UE, odsetek recyklingu odpadów komunalnych, a także zakres ich selektywnej zbiórki jest zdecydowanie niewystarczający. Unia Europejska wymusza na Polsce podjęcie starań w celu poprawy gospodarki odpadami komunalnymi poprzez: rozwój efektywnego systemu selektywnej zbiórki i segregacji odpadów, zwiększenie ilości recyklingu i realizacji wymogów prawnych dotyczących produkcji i stosowania opakowań podlegających biorozkładowi, co umożliwi ich szybką neutralizację.

Identyczna sytuacja ma miejsce w gospodarowaniu odpadami medycznymi. Często odpady medyczne bez odpowiedniego zabezpieczenia trafiają na wysypiska odpadów komunalnych lub spalane są w kotłowniach szpitalnych. Problematyka prawidłowego usuwania i unieszkodliwiania odpadów medycznych stanowi aktualnie jeden z istotnych problemów dostrzeganych przez służby sanitarno-epidemiologiczne i ochrony środowiska [1].

Polimery pod wpływem takich czynników jak: ciepło, woda, promieniowanie słoneczne, naprężenia, tlenki siarki i azotu, tlen, metale, mikroorganizmy ulegają samodegradacji, ale ten proces w wyniku stosowania stabilizatorów jest bardzo długi, co skutkuje rozkładem sięgającym setek

## FILLERS ENHANCING PHOTO-BIO-DEGRADATION OF MEDICAL POLYMER WASTES

ANNA SOBCZYK-GUZENDA<sup>1\*</sup>, MARIUSZ KACZMAREK<sup>2</sup>,  
USTYNA GRZYWACZ<sup>1</sup>, HIERONIM SZYMANOWSKI<sup>1</sup>,  
MACIEJ GAZICKI-LIPMAN<sup>1</sup>, BOGUSŁAW WOŹNIAK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,  
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, 1/15 STEFANOWSKIEGO STR., 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

<sup>2</sup>REGIONAL DEVELOPMENT AGENCY IN ŁÓDŹ,  
22/26 TUWIMA STR., 90-002 ŁÓDŹ, POLAND

<sup>3</sup>LEATHER INDUSTRY INSTITUTE,  
73 ZGIERSKA STR., 91-462 ŁÓDŹ, POLAND

\*MAILTO: ANNA.SOBCZYK-GUZENDA@P.LODZ.PL

### Abstract

A method of plasma chemical modification of fillers for photo-bio-degradable composite materials is described. In these materials, a synthetic polymer constitutes a matrix, with the fillers being natural polymer (starch) and titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ), both aimed at a substantial quickening of the matrix degradation process. It has been assumed that such a composite will exhibit photocatalytic properties, stirred by the irradiation with the UV-B light. In this work, the effect of surface modification of the filler on its physical and chemical properties is described. For the determination of starch wettability, the effect of water capillary elevation was used. An assessment of the degree of cross-linking was made on the basis of the Fourier transform infrared (FTIR) absorption analysis.

**Keywords:** RF PECVD method, surface modification of fillers, photodegradation, biodegradation, composite materials

*[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 62-65]*

### Introduction

Compared to the most developed EU countries, the extent of the selective collection of communal wastes and the percentage of their recycling in Poland is definitely not sufficient. The European Union coerces efforts aimed at the improvement of communal waste management through: a development of an effective system of selective waste collection and segregation, an increase of recycling percentage and a reinforcement of legal requirements concerning manufacture and use of biodegradable packaging materials allowing their quick neutralization.

Similar situation concerns a management of medical wastes. Too often, medical wastes are either directed to communal waste depositories without any protection or they are burned in hospital heating appliances. The question of appropriate removal and neutralization of medical wastes constitutes nowadays one of the serious problems of country's sanitary and medical services as well as authorities responsible for environmental issues [1]. Under the effect of such factors as heat, water, sun radiation, stress, sulphur and nitrogen oxides, oxygen, metals, microorganisms, polymers undergo spontaneous degradation but, due to the use of stabilizing additives, the process is very slow and it results in centuries long decomposition. The synthetic biodegradable polymers are, on the other hand, very expensive [2].

This is a reason why one of the preferred directions of research and development is comprised of combining two



lat. Z kolei syntetyczne biodegradowalne polimery są nadal bardzo drogie [2].

Dlatego też jednym z rozwijanych kierunków badań jest łączenie dwóch typów polimerów polimeru syntetycznego (trudno ulegającego biodegradacji) z polimerami biodegradowalnymi (łatwo ulegającym temu procesowi). Obecnie rozwijane technologie najczęściej dotyczą wykorzystania skrobi i celulozy oraz polilaktydu [3]. Obecność biodegradowalnego napelnacza który szybko ulega procesowi biodegradacji prowadzi do zmniejszenia spoistości materiału, co prowadzi do osłabienia i rozdrobnienia całego materiału. Niestety ten sposób wytwarzania napotyka pewne trudności. Polimery naturalne posiadają ugrupowania silnie polarne, co prowadzi do problemów w mieszalności z polimerami tradycyjnymi, które posiadają ugrupowania niepolarne. Objawia się to niedostatecznym zwilżaniem polimeru naturalnego przez ciekły polimer syntetyczny w procesie wytwarzania kompozytu. Prowadzi to do aglomeracji ziaren polimeru naturalnego co ma ogromny negatywny wpływ na właściwości mechaniczne otrzymanego kompozytu [4].

Kolejną próbą rozwiązania problemu degradacji polimerów, opisywanym coraz częściej w najnowszej literaturze jest tworzenie materiałów kompozytowych na bazie polimeru syntetycznego z ditlenkiem tytanu ( $\text{TiO}_2$ ) [5].  $\text{TiO}_2$  znajduje szerokie zastosowanie ze względu na swoją unikatową aktywność fotokatalityczną [6]. Niestety podczas wytwarzania kompozytów z zastosowaniem  $\text{TiO}_2$  obserwuje się podobne zjawisko aglomeracji fotoaktywnego napelnacza. Powstające aglomeraty mogą mieć rozmiary kilkunastu mikrometrów. Spowodowane jest to znaczną różnicą w wielkości energii powierzchniowej napelnacza w matrycy węglowej [5].

W niniejszej pracy omówiono modyfikację napelnaczy takich jak skrobia oraz  $\text{TiO}_2$  z wykorzystaniem techniki RF PECVD (radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition). Modyfikacja ta ma na celu zmianę energii powierzchniowej ziaren napelnacza, w szczególności zaś zmianę składników polarnego i despersyjnego tej energii. W późniejszym etapie badań zmodyfikowane napelnacze zostaną wykorzystane do wytworzenia mieszanek z polimerami syntetycznymi takimi jak polichlorek winylu czy polistyren, które mają w trakcie użytkowania wykazywać właściwości samoczyszczące, a po upływie tego czasu mają ulegać szybszej degradacji niż sam polimer stanowiący matrycę.

## Materialy i metody

Jednym z zastosowanych napelnaczy jest skrobia ziemniaczana Superior Standard wytwarzana przez Zakłady Przemysłu Ziemniaczanego w Pile ZETPEZET o wielkości ziarna od 5÷12 nm. Drugim jest komercyjny proszek ditlenku tytanu o nazwie handlowej Aeroxide P25 wyprodukowany przez firmę Evonik Degussa GmbH o średniej wielkości ziarna 21nm.

Proces modyfikacji był przeprowadzany w obrotowym reaktorze RF PECVD przedstawionym na RYSUNKU 1. W skład niniejszej aparatury wchodzi następujące układy: obrotowa komora reaktora w.cz., układ zasilania polem elektrycznym w.cz., układ zasilający reaktor w gaz roboczy, układ próżniowy wraz z systemem rejestracji ciśnienia.

Jako gaz roboczy został wykorzystany metan, którego przepływ był zmieniany w zakresie od 2÷10sccm. Ciśnienie wyjściowe przed modyfikacją (bez gazu) wynosiło 0.15Torr. Moc wyładowania jarzeniowego była zmieniana w zakresie od 10÷100W. Optymalny czas trwania procesu modyfikacji został ustalony na poziomie 2 minut.

Do oceny zwilżalności skrobi wykorzystano zjawisko kapilarnego wniesienia wody. W tym celu użyta zo-

types of polymers: a synthetic polymer (difficult to degrade) and a biodegradable polymer (easy to degrade). As far as the latter material is concerned, the technologies developed contemporarily make use of such polymers as starch, cellulose and polylactide [3]. The presence of a biodegradable filler, which decomposes relatively quickly, results in a loss of material's density, and, consequently, it leads to its disintegration. This process certainly accelerates a degradation of the matrix synthetic polymer as well.

Unfortunately, there are certain issues of complicatedness regarding a realization of the above idea. Natural polymers contain strong polar moieties, which results in difficulties with their mixability with synthetic polymers, usually built of non-polar constituents. Low mixability is due to the insufficient wetting of the filler particles with the melt of synthetic polymer during the manufacture of a composite material, and it leads to filler particle agglomeration thus substantially worsening the composite's mechanical properties [4].

Another attempt to address the question of polymer quickened degradation, found in the latest literature, comprises designing composite materials with synthetic polymer as matrix and titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) as a filler [5]. Due to its unique photocatalytic properties, the presence of  $\text{TiO}_2$  in the material should enhance the process of its photodegradation [6]. Unfortunately, the manufacture process of such composites encounters the same difficulties comprising agglomeration of the photoactive filler. Due to substantial differences in surface energy of filler particles in the carbon matrix [5], the resulting agglomerates may have dimensions as large as several micrometers.

In the present work, a surface modification of such particulate fillers as starch and  $\text{TiO}_2$  with the help of radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition (PE CVD) technique is described. The modification is aimed at a substantial change of the filler's surface energy, and of the polar and dispersive components of this energy, in particular. At subsequent stages of the research, such surface modified fillers will be used to form blends with such synthetic polymers as poly(vinyl chloride) and polystyrene. Composite materials, produced in this way, are supposed to exhibit self-cleaning properties and following their designed performance period, they should rapidly decompose.

## Materials and methods

One of the fillers used in this work is potato starch Superior Standard, manufactured by ZETPEZET company in Piła, of grain size in the range of from 5÷12µm. The other one is Aeroxide P25 commercial titanium dioxide powder of an average grain size of 21nm, produced by Evonik Degussa GmbH.

The filler surface modification process was carried out in a PE CVD tumbler reactor, presented in FIGURE 1. The elements of this reactor comprise: rotating reactor chamber, RF field supply system, gas supply system and vacuum system equipped with pressure control and recording. Methane was used as working gas, with its flow rate varying between 2 and 10sccm. The background pressure was 0.15Torr and the RF power was varied in the range of 10÷100 Watt. The optimum modification time of 2 minutes was selected.

Capillary elevation of water was used to assess the filler's wettability. For that purpose, a Ø1,8mm capillary was filled, to the height of 80mm, with either starch or titanium dioxide, immersed at one end in water and water capillary elevation was measured. In both cases unmodified filler was used as reference.

Samples of starch and titanium dioxide, both unmodified and modified, were subjected to infrared spectroscopic

stała szklana rurka o średnicy wewnętrznej 1,8 mm jednym końcem zanurzona w wodzie. Rurka ta do wysokości wynoszącej 80 mm napełniana była skrobią i  $\text{TiO}_2$ .

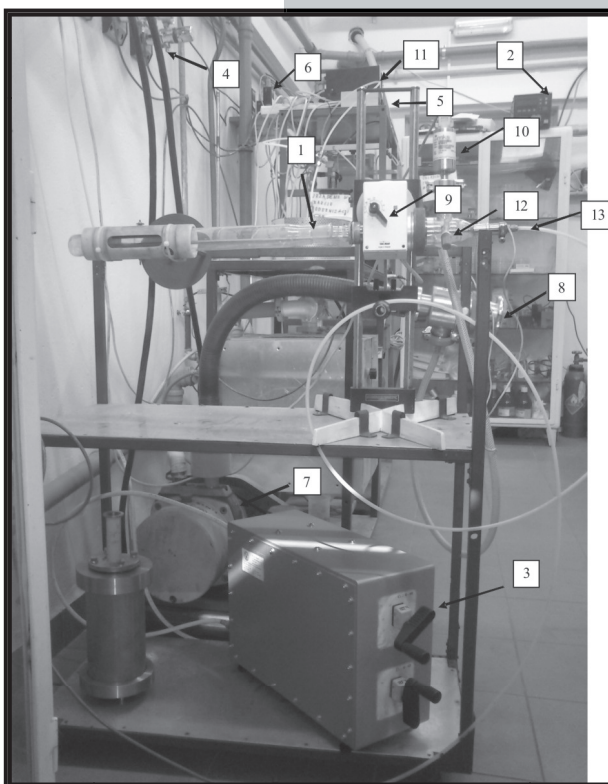
Próbki skrobi oraz dioksydu tytanu niemodyfikowanych oraz modyfikowanych poddane zostały analizie spektroskopowej w podczerwieni. Do tego celu użyto spektrometru FTIR firmy BioRad, model 175C wyposażonego w przystawkę firmy Harric Sci. do badań powierzchni próbek w postaci sproszkowanej.

## Wyniki i dyskusja

Modyfikacja plazmochemiczna ma na celu doprowadzić do zmiany charakteru oddziaływań powierzchniowych na granicy faz matryca-napełniacz co umożliwia otrzymanie homogenicznych kompozytów. Modyfikacja skrobi i dioksydu tytanu doprowadziła do zmian właściwości powierzchniowych, polegająca na wzroście hydrofobowości poszczególnych ziaren.

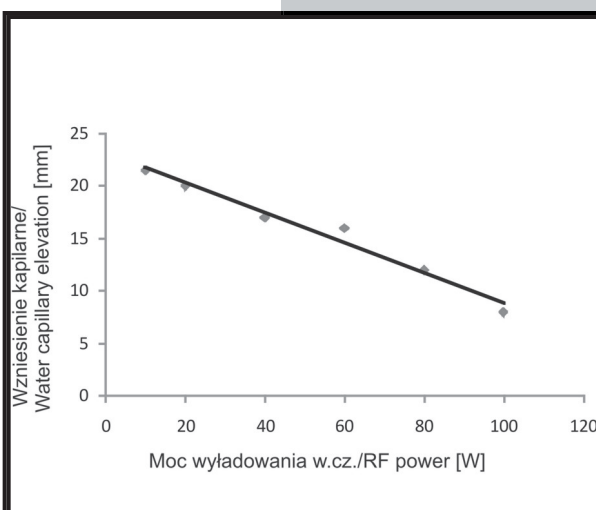
Na RYSUNKU 2 przedstawiono przykładową zależność wzniesienia kapilarnego w funkcji mocy wyładowania jarzeniowego dla przepływu metanu równego 6 sccm. Otrzymane wyniki wykazują zależność malejącą w całym zakresie zastosowanej mocy od 10÷100 W. Zastosowanie wartości mocy przekraczających 100 W było niemożliwe ze względu na postępującą degradację termiczną ziaren skrobi w trakcie procesu modyfikacji. Ponadto otrzymane wyniki dowodzą także, że zwiększanie przepływu gazu roboczego wpływa na intensyfikację efektu hydrofobowego modyfikowanych materiałów.

Efekt zmian jakie zaszły po modyfikacji skrobi w plazmie metanowej widoczne są także w przykładowym widmie FTIR przedstawionym na RYSUNKU 3. Pokazane są na nim zmiany jakie zaszły przed i po modyfikacji przy dwóch zastosowanych skrajnych mocach wyładowania. Jedyne widoczne zmiany w widmie transmisyjnym zarejestrowane zostały w zakresie liczb falowych  $2800\div3000\text{ cm}^{-1}$ , odpowiadającym drganiom rozciągającym wiązania C-H. Pasma transmisji przy  $2972\text{ cm}^{-1}$  przypisane jest asymetrycznym drganiom rozciągającym wiązania C-H w grupach metylo- wych. Z kolei pasma transmisji przy  $2940\text{ cm}^{-1}$  i  $2927\text{ cm}^{-1}$  odpowiadają asymetrycznym drganiom rozciągającym tego wiązania w grupach



**RYS. 1.** Zdjęcie stanowiska do plazmo-chemicznej modyfikacji materiałów sypkich: 1-obrotowa komora reaktora, 2-generator w.c.z., 3-układ dopasowania mocy, 4-układ zasilania gazami, 5-regulator przepływu gazów, 6-przepływomierze, 7-pompa, 8-zawór główny, 9-mechanizm obrotowy, 10-sonda do pomiaru ciśnienia, 11-panel odczytu ciśnienia, 12 - zawór zapowietrzający, 13 - linia doprowadzająca gaz do komory reaktora.

**FIG. 1.** Picture of the apparatus of plasma-chemical modification of bulk materials: 1-rotary reactor chamber, 2-RF generator, 3-matching system, 4-gas supply system, 5-gas flow regulator, 6-flow meters, 7-pump, 8-main valve, 9-rotary mechanism, 10-pressure gauge, 11-pressure panel, 12-aeration valve, 13-gas supply line.



**RYS. 2.** Wzniesienie kapilarne wody dla skrobi modyfikowanej metanem w funkcji mocy wyładowania jarzeniowego.

**FIG. 2.** Water capillary elevation for modified starch as a function of glow discharge power.

absorption measurements using BioRad FTIR, model 175C, spectrometer equipped with the Harric Sci. unit for particulate specimens.

## Results and discussion

The aim of the plasma chemical surface modification of the filler particles was to change the nature of interface matrix-filler interactions and, therefore, to enable a manufacture of homogeneous composite materials. In both cases, those of starch and titanium dioxide, the modification led to a change of surface properties, consisting in an increase of the particles' hydrophobicity.

An example of a dependence of water capillary elevation of starch modified in methane plasma on the RF Power of discharge, for methane flow rate of 6 sccm, is presented in FIGURE 2. The results show a decreasing relationship in the entire range of power, namely between 10 and 100 Watt. An application of power values higher than 100 Watt resulted in a degradation of starch particles during the modification process. In addition, the results show that an increase of the flow rate of methane working gas brings about an intensification of the hydrophobic effect.

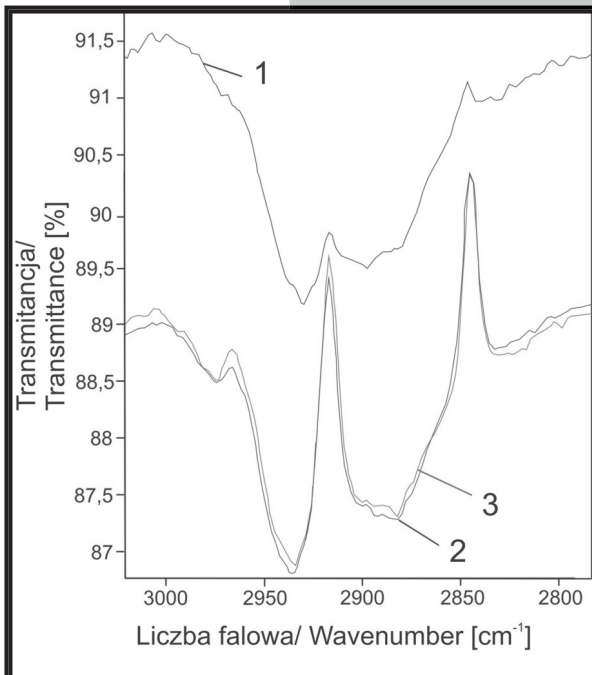
The effects of surface starch modification with methane plasma are also evident when examined with the FTIR spectroscopy. Figure 3 presents the FTIR spectra of starch before and after modification under conditions of two substantially differing RF power levels. All the recorded changes take place in the wavenumber range of  $2800\div3000\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the stretching vibrations of aliphatic C-H bonds. The absorption band at  $2972\text{ cm}^{-1}$  is due to stretching vibrations of C-H bond in methyl groups, while the bands at  $2940\text{ cm}^{-1}$  and  $2927\text{ cm}^{-1}$  correspond asymmetric vibrations of this bond in methylene groups. Finally, the  $2906\text{ cm}^{-1}$  and  $2883\text{ cm}^{-1}$

metylenowych, zaś pasma przy  $2906\text{ cm}^{-1}$  i  $2883\text{ cm}^{-1}$  jego drganiom rozciągającym w grupach metinowych.

## Wnioski

Otrzymane wyniki dowodzą, że procesy plazmochemicznej modyfikacji napełniaczy wpływają na zwiększenie hydrofobowości, a przez to prawdopodobnie na obniżenie składowej polarnej. Pozwala to sformułowanie założenia, że tak zmodyfikowane napełniacze będą charakteryzowały się wysokim stopniem zdyspersgowania ich w matrycy polimeru syntetycznego takiego jak polistyren czy polichlorek winylu.

Otrzymane zmiany w zapisie widma FTIR pomiędzy niemodyfikowanym, a modyfikowanym napełniaczem świadczą o wzrastającej liczbie zarówno grup metylenowych jak i trójfunkcyjnych ugrupowań metinowych w odniesieniu do ilości grup metylenowych. Podczas gdy szczepienie grup metylenowych na powierzchni prowadzi bezpośrednio do wzrostu hydrofobowości modyfikowanego materiału, to zwiększenie stosunku liczby grup metinowych do liczby grup metylenowych świadczy o istnieniu zjawiska powierzchniowego sieciowania.



**RYS. 3. Widmo absorpcyjne IR dla skrobi: 1–niemodyfikowanej, 2–modyfikowanej przy 10W, 3–modyfikowanej przy 100 W.**

**FIG. 3. IR absorption spectrum for starch: 1-unmodified, 2-modified at 10W, 3-modified at 100 W.**

are due to stretching vibrations of C-H bond in methine groups.

## Conclusions

The results acquired show that surface modification of a filler with the help of methane plasma results in its increasing hydrophobicity and should, therefore, lower the polar component of its surface energy. This allows one to formulate an assumption that this kind of modification of filler particles will help to manufacture, from a matrix of synthetic polymer such as polystyrene or poly(vinyl chloride), composite materials of high dispersity.

The changes in FTIR spectra between unmodified and modified fillers, recorded in this work, reveal an enrichment of both methyl groups and three-functional methine functions, compared to methylene groups. While surface grafting of methyl groups leads to material's increased hydro-

phobicity, a growth of methine/methylene ratio is a result of its surface cross-linking.

## Piśmiennictwo

- [1] Krajowy plan gospodarki odpadami (KPGO), sporządzony jako realizacja przepisów ustawy z dnia 27 kwietnia 2001 roku o odpadach (Dz.U. Nr 62, poz.628 oraz z 2002 roku Nr 41, poz. 365 i Nr 113, poz. 984).
- [2] Bordes P., Pollet E., Avérous L.: Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. Prog. Polym. Sci. 28 (2003) 1539-1641.
- [3] Van Volkenburgh W.R., White M.A.: Overview of Biodegradable Polymers and Solid-Waste Issues. Tappi Journal, 76 (1992) 193-197.

## References

- [4] Aburto J., Thiebaud S., Alric I., Borredon E., Bikiaris D., Prinós J., Panayiotou C.: Properties of Octanoated Starch and Its Blends with Polyethylene. Carbohydr. Polym. 34 (1997) 101-112.
- [5] Miyauchi M., Li Y., Himidu H.: Enhanced Degradation in Nanocomposites of  $\text{TiO}_2$  and Biodegradable Polymer. Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4551-4554.
- [6] Macwan • Pragnesh D. P., Chaturvedi N.D.S.: A review on nano- $\text{TiO}_2$  sol-gel type syntheses and its applications. J Mater Sci 46 (2011) 3669-3686.



## PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH BIODEGRADOWALNYCH KOMPOZYTÓW PODWÓJNYCH I POTRÓJNYCH NA OSNOWIE PCL

KAROLINA KORZEB, JOANNA IDASZEK\*, WOJCIECH ŚWIĘSZKOWSKI

POLITECHNIKA WARSZAWSKA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
WOŁOSKA 141; 02-507 WARSZAWA, POLSKA  
\*MAILTO: WOJCIECH.SWIESZKOWSKI@INMAT.PW.EDU.PL

### Streszczenie

*Celem poniższych badań było porównanie właściwości mechanicznych włókien kompozytów polimero-ceramicznych na osnowie polikaprolaktonu (PCL) jako potencjalnego materiału do wytworzenia rusztek do regeneracji ubytków tkanki kostnej w organizmie człowieka. Jako napelniacz wykorzystano mikrocząstki trójfosforanu wapnia (TCP). Wytworzono również kompozyt potrójny zawierający dodatkowo kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA). Przeprowadzono próbę rozciągania oraz obserwację na skaningowym mikroskopie elektronowym. Wprowadzenie mikrocząstek TCP do osnowy PCL tylko w małym stopniu poprawiło właściwości mechaniczne kompozytów. Dopiero dodatek PLGA spowodował znaczny wzrost sztywności oraz podwyższenie granicy plastyczności.*

**Słowa kluczowe:** PCL, PLGA, trójfosforan wapnia (TCP), metoda szybkiego prototypowania, właściwości mechaniczne.

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 66-68]

### Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa to alternatywa dla tradycyjnych terapii leczenia ubytków tkanek. Wykorzystuje się w niej materiały biodegradowalne. Materiały te nie mogą wywoływać stanów zapalnych w organizmie, powinny być możliwe do przetwarzania w sposób powtarzalny oraz posiadać właściwości mechaniczne dopasowane do danej aplikacji [1]. PCL to biogodny oraz biodegradowalny poliester alifatyczny [2], który spełnia większość z wyżej wymienionych wymagań. PCL dzięki niskiej temperaturze topnienia (~60°C) oraz wysokiej stabilności termicznej jest dodatkowo bardzo łatwy do przetwarzania. Polimer ten, ze względu na swoją hydrofobowość oraz wysoką krystaliczność, wolno ulega degradacji. Wprowadzenie do osnowy PCL cząstek bioaktywnego napelniacza powoduje zmianę profilu degradacji, właściwości mechanicznych oraz biogodności osnowy [3]. Stężenie napelniacza jest jednak ograniczone ze względu na wzrost kruchości kompozytów polimerowych przy jego wyższych stężeniach. Dlatego, w celu polepszenia właściwości mechanicznych PCL, podjęto próbę wytworzenia kompozytu potrójnego zawierającego dodatkowo frakcję polimeru o lepszych od PCL właściwościach mechanicznych.

Jako zbrojenie kompozytów w prezentowanych badaniach wykorzystano bioaktywny trójfosforan wapnia (TCP). Kompozyt potrójny zawierał dodatkowo poli(D,L-laktyd-glikolid), PLGA.

Celem niniejszej pracy było wytworzenie metodą szybkiego prototypowania włókien kompozytowych na osnowie PCL

## COMPARISON OF MECHANICAL PROPERTIES OF BIODEGRADABLE PCL-BASED BINARY AND TERNARY COMPOSITES

KAROLINA KORZEB, JOANNA IDASZEK\*, WOJCIECH ŚWIĘSZKOWSKI

WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND ENGINEERING;  
141 WOŁOSKA STREET; 02-507 WARSZAW, POLAND  
\*MAILTO: WOJCIECH.SWIESZKOWSKI@INMAT.PW.EDU.PL

### Abstract

*The aim of present study was to compare the mechanical properties of binary and ternary composite fibers fabricated by means of combined solvent casting and fused deposition modeling techniques. The tested composites were composed of polycaprolactone (PCL) matrix and tricalcium (TCP) micro-particles (binary composite) and additionally poly(D,L-lactide-co-glycolide), PLGA, (ternary composite). TCP and PLGA were used as a reinforcement of the composites. Tensile test was conducted in order to determine the effect of TCP and PLGA on mechanical properties of the composites. Introduction to TCP particles had slight effect of the Young's modulus. However, addition of TCP and PLGA to PCL matrix significantly improved the mechanical properties of the ternary composite.*

**Keywords:** PCL, PLGA, tricalcium phosphate (TCP), rapid prototyping, mechanical properties.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 66-68]

### Introduction

Tissue engineering (TE) is an alternative to traditional therapies for treatment of tissue defects. The biodegradable polymers used for TE applications should not induce any permanent inflammation, be processable on a repetitive basis, and exhibit mechanical properties suitable for a targeted application [1]. PCL is a biocompatible and biodegradable aliphatic polyester [2], which meets most of the above mentioned requirements. PCL, due to its low melting point (~60°C) and high thermal stability is also very easy to process. This polymer, because of its hydrophobicity and high crystallinity, undergoes very slow degradation. Introduction of bioactive filler, for example tricalcium phosphate (TCP), to the PCL matrix changes the degradation profile of the polymer, its mechanical properties and biocompatibility of the matrix [3]. The concentration of the filler is, however, limited due to embrittlement of the material. Therefore we decided to introduce a third phase to the binary composite: a polymer with better than PCL mechanical properties.

The goal of this study was to produce binary (PCL-TCP) and ternary (PCL-PLGA-TCP) composite fibers by means of fused deposition modeling (FDM) technique and examine their tensile properties.

### Materials and methods

The following materials were used: PCL (PCL, Sigma-Aldrich, UK), PLGA (RESOMER® RG 504 H, Boehringer-Ingelheim, Germany), TCP (nanoXIM-TCP201, FLUIDINNOVA, Portugal). The composites were prepared by solvent casting

oraz zbadanie właściwości mechanicznych wytworzonych materiałów.

## Materiały i metody

Do wytworzenia kompozytów użyto PCL (PCL, Sigma-Aldrich, Wielka Brytania), PLGA (RESOMER® RG 504 H, Boehringer-Ingelheim, Niemcy), oraz mikro- cząstek TCP (nanoXIM-TCP201, FLUIDINOVA, Portugalia). Kompozyty polimerowo-ceramiczne przygotowano metodą odlewania z roztworu. Do wytworzenia włókien użyto techniki FDM (Fused Deposition Modeling), która polega na przyrostowym formowaniu, np. rusztowania, uplastycznionym polimerem. Włókna wydrukowano przy pomocy urządzenia Bioscaffolder (SYSENG, Niemcy).

Wytworzono włókna o kompozycji i parametrach procesu podanych w TABELI 1.

Następnie przeprowadzono statyczną próbę rozciągania włókien na maszynie wytrzymałościowej Tytron 250 (MTS, USA). Próbkę rozciągano z szybkością  $V=15\text{mm/min}$ .

Dodatkowo przeprowadzono obserwację mikroskopową na skaningowym mikroskopie elektronowym TM 3000 (Hitachi, Japonia). Zdjęcia wykonywano przy napięciu 15keV oraz przy różnych powiększeniach.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki obserwacji mikroskopowych wytworzonych materiałów zamieszczono na zdjęciach SEM (RYS. 1).

W przypadku czystego PCL (RYS. 1a) obserwowano gładką, jednolitą powierzchnię włókna. Dla kompozytów zbrojonych mikrocząstkami TCP (RYS. 1b-1d) obserwowano równomierne rozłożenie cząstek w osnowie. Nie zauważono skupisk aglomeratów. Wytworzone materiały posiadały powtarzalne wymiary. Na podstawie wykresów rozciągania (krzywe naprężenie-odkształcenie) wyznaczono moduł Younga (RYS. 2) oraz granicę plastyczności (RYS. 3) wytworzonych kompozytów. Czysty PCL użyto jako materiał referencyjny. Analizując wpływ napelnacza na moduł Younga (RYS. 2) wytworzonych materiałów stwierdzono nieznaczne zwiększenie sztywności kompozytu PCL-TCP w porównaniu do czystego PCL. Natomiast w przypadku dodania do osnowy 20% wag. PLGA zauważono znaczny wzrost sztywności kompozytu do wartości 417 MPa. Granica plastyczności (RYS. 3) dla materiału referencyjnego wynosiła 12 MPa. W przypadku dodania do PCL 10% cząstek TCP zaobserwowano niewielki wzrost granicy plastyczności do 13MPa. Wzrost był prawdopodobnie spowodowany obecnością twardych cząstek napelnacza. W przypadku kompozytów w osnowie z PLGA dostrzeżono wzrost granicy plastyczności do 16 MPa. Powyższe wyniki wykazują, że kompozyty z cząstkami

**TABELA 1. Skład wytworzonych materiałów oraz temperatura procesu.**

**TABLE 1. Composition of the prepared materials and temperature of the FDM process.**

Nazwa / Name	PCL [wag.% / wt%]	PLGA [wag.% / wt%]	Mikro-TCP [wag.% / wt%]	Temp. procesu / Temp. of the process [°C]
PCL	100	-	-	100
PCL-TCP	90	-	10	100
PCL-PLGA-TCP	70	20	10	105

technique. A Fused Deposition Modeling device (Bioscaffolder; SYSENG, Germany) was used to fabricate fibers. The FDM is an extrusion-based process, which enables fabrication of porous three-dimensional structures layer by layer. The composition of produced fibers and temperature of fabrication process are given in TABLE 1.

Static tensile test of the fibers was carried out using a mechanical testing machine Tytron 250 (MTS, USA) at a cross-head speed of 15mm/min. The Young's modulus was determined as the slope of the linear range of stress-strain curve. The yield strength was calculated as a stress at 1% strain.

In addition, a scanning electron microscope (TM 3000; Hitachi, Japan) observation were carried out in order to observe surface morphology of the fibers. The images were taken at acceleration voltage of 15 keV and at various magnifications.

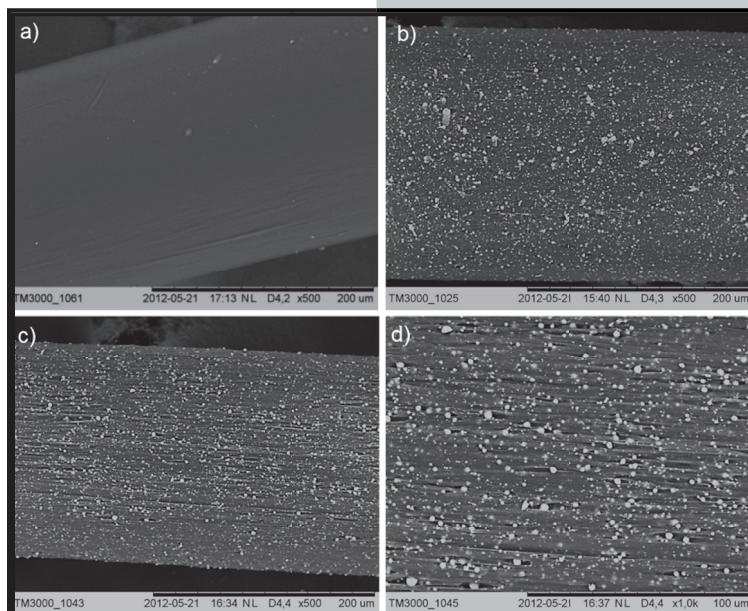
## Results and discussions

The results of microscopic observations are presented on FIG. 1.

In the case of pure PCL (FIG. 1a) a smooth, uniform surface of the fiber was observed. Composites reinforced with microparticles (FIG. 1b-1c) showed uniform distribution of particles in the matrix. The resulting composite fibers had repeatable geometry.

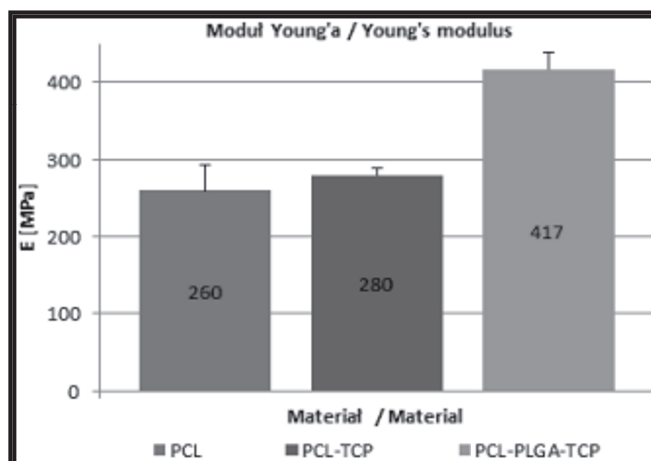
The results of tensile test are presented in FIG. 2 (Young's modulus) and in FIG. 3 (yield strength).

Neat PCL was used as reference material. Addition of TCP increased only a slightly stiffness of the binary composite, if compared to PCL. However, in case of addition of 20 wt% of PLGA a significant increase of the stiffness was observed ( $E=417\text{ MPa}$ ). The yield strength (FIG. 3) for the reference material was 12 MPa. Addition of 10% TCP particles resulted in a small increase of yield strength to 13MPa. The increase was probably due to the presence of hard particles of the filler. In case of the ternary composite presence of PLGA in the PCL matrix increased yield strength



**RYS. 1. Obrazy SEM wytworzonych materiałów: a) PCL (x500), b) PCL-TCP (x500), c) PCL-PLGA-TCP (x500), d) PCL-PLGA-TCP (x1000).**

**FIG. 1. SEM micrographs of the prepared materials: a) PCL (x500), b) PCL-TCP (x500), c) PCL-PLGA-TCP (x500), d) PCL-PLGA-TCP (x1000).**



RYS. 2. Wartości modułu Younga dla badanych kompozytów.

FIG. 2. The values of Young's Modulus of the tested composites.

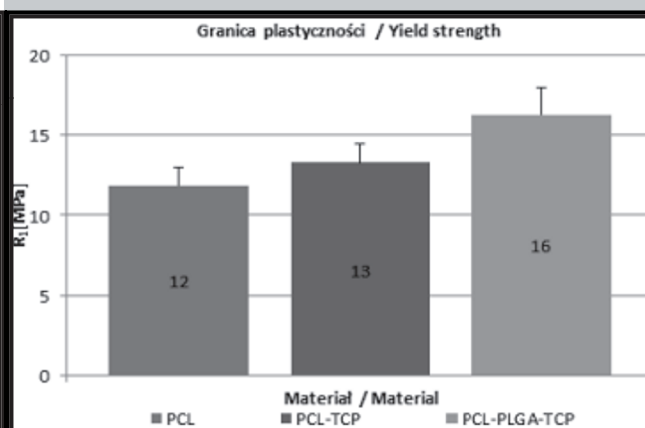
kami TCP i obecnością w osnowie PLGA mają właściwości mechaniczne zbliżone do kości beleczkowej [4].

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że dodatek mikrocząstek TCP oraz PLGA znacząco zwiększyły sztywność i granicę plastyczności badanych materiałów. Proces wytwarzania kompozytów o osnowie PCL metodą szybkiego prototypowania jest powtarzalny i może być stosowany jako metoda produkcji rusztowań do zastosowań w inżynierii tkankowej.

## Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych” finansowanego z Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (Nr projektu POIG.01.01.02-00-022/09).



RYS. 3. Wartości granicy plastyczności dla badanych kompozytów.

FIG. 3. The values of yield strength of the tested composites.

up to 16 MPa. These results show that composites reinforced with TCP particles and PLGA inclusions present in PCL exhibit mechanical properties similar to trabecular bone [4].

## Conclusions

Based on presented results it can be concluded that addition of TCP microparticles and PLGA to the PCL matrix significantly increased the stiffness and yield strength of the PCL. The fabrication process of the PCL-based composites by means of combined solvent casting and rapid prototyping method is repeatable and can be used as a method for fabrication of scaffolds for tissue engineering applications.

## Acknowledgments

This work was supported by the European Regional Development Fund within the Innovative Economy Operational Programme in the frame of project BIO-IMPLANT (Grant No. POIG.01.01.02-00-022/09).

## Piśmiennictwo

- [1] Lakshmi S. Nair, Cato T, Laurencin: Biodegradable polymers as biomaterials, Prog. Polym. Sci. 32, 2007, (762-789).
- [2] Woodruff M. A., Hutmacher D. W.: The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century, Prog. Polym. Sci. 35, 2010, (1217-1256).

## References

- [3] red. Nałęcz M.: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna, Tom 4: Biomateriały, Wyd. EXIT, Warszawa 2003.
- [4] S. A. Goldstein: The mechanical properties of trabecular bone dependence on anatomic location and function, J. Biomechanics, Vol. 20, No 11 12, pp.1055-1061; 1987.



# SUPERSPRĘŻYSTE ZACHOWANIE DRUTÓW NiTi PODCZAS ZGINANIA

ZDZISŁAW LEKSTON<sup>1\*</sup>, PIOTR LACKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET ŚLĄSKI, INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLSKA

<sup>2</sup> POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA,  
UL. DĄBROWSKIEGO 69, 42-200 CZĘSTOCHOWA, POLSKA

\*MAILTO:ZLEKSTON@US.EDU.PL

## Streszczenie

*W pracy przedstawiono supersprężyste właściwości drutów NiTi badane w testach rozciągania i zginania. Druty te użyto do przygotowania klamer do zespożeń złamań kości twarzy oraz sprężyn do plastyki czaszki. Przy projektowaniu implantów zastosowano modelowanie odkształcania metodą elementów skończonych. Uzyskano dobrą korelację krzywych symulowanych przy użyciu programu Adina z krzywymi eksperymentalnymi uzyskanymi podczas cyklicznego, trójpunktowego zginania drutów oraz dystraktorów czaszkowych. Wprowadzenie do programu odpowiednich parametrów charakteryzujących badane materiały umożliwi obliczanie wielkości naprężeń zredukowanych i odkształceń oraz ułatwi projektowanie wymaganych własności implantów o bardziej złożonych kształtach.*

**Słowa kluczowe:** druty NiTi, supersprężystość, MES, trójpunktowe zginanie, implanty NiTi

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 69-72]

## Wprowadzenie

Zjawisko supersprężystości występujące w stopach NiTi jest wykorzystywane w wielu urządzeniach medycznych, takich jak: druty ortodontyczne, klamry do osteosyn-tezy, stenty, druty -prowadniki medyczne, instrumenty endodontyczne i inne [1,2]. Druty NiTi wykazujące właściwości supersprężyste użyto w badaniach własnych do przygotowania prototypowych implantów, które zastosowano w badaniach klinicznych jako klamry do zespożeń złamań kości twarzy oraz sprężyny wspomagające modelowanie czaszki w leczeniu kraniostenoz u dzieci [3,4]. Przeprowadzono badania w testach cyklicznego rozciągania i trójpunktowego zginania. Uzyskano krzywe modelowe z symulacji programem Adina i porównano je z eksperymentalnymi krzywymi z testów trójpunktowego zginania. W modelowaniu numerycznym pętli supersprężystego zachowania drutu NiTi podczas cyklicznego rozciągania lub zginania ważne jest wprowadzenie do programu odpowiednich parametrów charakteryzujących analizowany materiał [5,6].

Celem tych badań była optymalizacja właściwości drutów dla przygotowania super-sprężystych klamer do zespożeń złamań kości oraz sprężyn dla plastyki czaszki.

## Materiał i metody

W badaniach użyto druty o średnicach 1,0 mm, 1,1 mm, 1,2 mm i 1,3 mm ze stopu o składzie chemicznym Ti-50,8% at. Ni. Supersprężyste własności drutów mierzono w próbach rozciągania na maszynie wytrzymałościowej Instron 4469 oraz w próbach trójpunktowego zginania na mini

# SUPERELASTIC BEHAVIOR OF NiTi WIRES IN BENDING

ZDZISŁAW LEKSTON<sup>1\*</sup>, PIOTR LACKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
12 BANKOWA STR., 40-007 KATOWICE, POLAND

<sup>2</sup> CZESTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
69 DABROWSKIEGO STR., 42-200 CZESTOCHOWA, POLAND

\*MAILTO:ZLEKSTON@US.EDU.PL

## Abstract

*The paper presents the superelastic properties of NiTi wires tested in tensile and bending tests. These wires were used to prepare staples for fixation bone fracture of the face and skull springs. In implants' designing the finite element modeling method was used for determining the deformation. A good correlation between simulated curves taken from ADINA System and experimental curves received in cyclic three-point bending wires was obtained. Making modifications to the ADINA system connected with relevant parameters, which characterize the investigated material, will enable establishing the size of reduced stresses and strains and facilitate the required properties of implants designing.*

**Key words:** NiTi wires, superelasticity, FEM, three - point bending, NiTi implants

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 69-72]

## Introduction

The superelastic behaviour of NiTi is applied in several medical devices, such as: orthodontic wires, osteosynthesis staples, stents, guide wires, endodontic instruments and other [1,2]. The prototype implants made from superelastic NiTi wires were used in the present study. The implants were clinically tested. They were used as the staples stabilizing bone fractures of the face or the springs supporting modeling of the skulls in craniostenosis treatment [3,4]. The tensile tests and three point bending tests of wires were carried out. The model curves obtained by Adina software simulation were compared with experimental curves from three-point bending tests. Using the proper parameters which characterize the analysed material are very important in numerical simulation, especially in behavior simulation of NiTi wire loop during the cyclic tension or bending [5,6].

The main aim of these studies was properties optimization of wires for preparing the superelastic bone staples and springs for cranioplasty.

## Material and methods

The NiTi wires with the chemical composition Ti-50.8 at.%Ni of diameters 1.0 mm, 1.1 mm, 1.2 mm and 1.3 mm were used in these studies. The superelastic properties of wires were measured by tensile tests on the Instron 4469 machine and by three-point bending tests on the mini strength machine TM 2. From above-mentioned wires the superelastic staples for osteosynthesis and springs for cranioplasty were prepared. Compression forces of staples and skulls distractors were measured by the usage of the TM2 machine. The simulated curves for superelastic effects under pure three-point bending tests were carried out by using the finite element analysis in the Adina System v. 8.7.3. software.

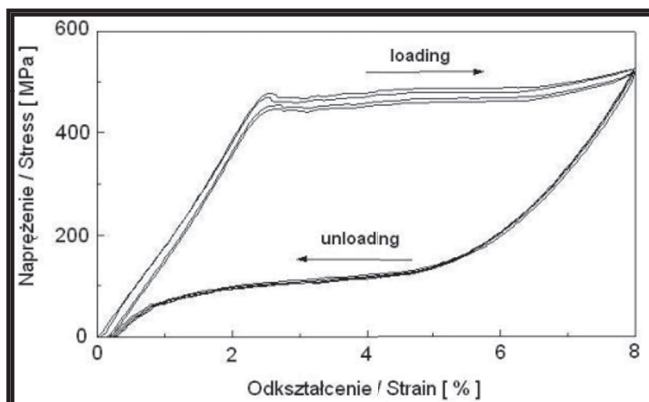
maszynie wytrzymałościowej TM 2. Z drutów przygotowano supersprężyste klamry do osteosyntezy oraz sprężyny do plastyki czaszki. Siły oddziaływań sprężyn i klamer mierzono również przy użyciu maszyny TM 2.

Symulowane krzywe supersprężystego zachowania drutów podczas trójpunktowego zginania uzyskano na podstawie analizy metodą elementów skończonych przy użyciu programu Adina 8.7.3.

## Wyniki i dyskusja

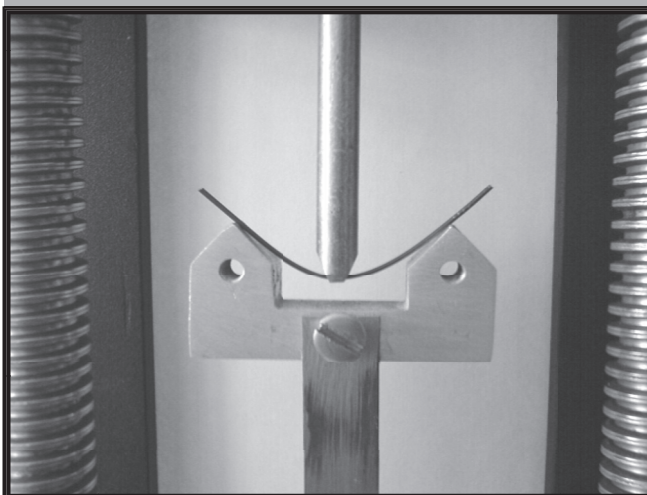
Testy rozciągania wykazały dobre własności mechaniczne badanych drutów [3]. Krzywe naprężenie-odkształcenie zarejestrowane podczas cyklicznego rozciągania i odciążania drutu o średnicy 1,2 mm w zakresie deformacji do około 8% pokazano na RYSUNKU 1. Na krzywych widoczne jest górne i dolne plateau naprężeń świadczące o supersprężystych właściwościach badanego drutu.

Charakterystyczne pętle supersprężystości obserwowano również na krzywych zmian siły w funkcji strzałki ugięcia zarejestrowanych w próbach cyklicznego, trójpunktowego zginania drutów. Na RYSUNKU 2 pokazano zmiany sił podczas zginania drutów o różnych średnicach na podporach w odległości 50 mm. Na krzywych widoczne jest plateau sił w szerokim zakresie deforma-



RYS. 1. Krzywe "naprężenie-odkształcenie" zarejestrowane podczas cyklicznego rozciągania i odciążania drutu NiTi.

FIG. 1. The tensile stress-strain curves recorded during cyclic loading and unloading of NiTi wire.



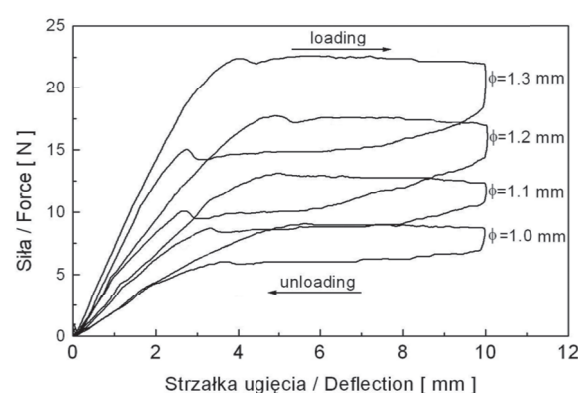
RYS. 3. Wygięty drut NiTi podczas próby trójpunktowego zginania.

FIG. 3. The NiTi wire bended on the mini strength machine TM2.

## Results and discussion

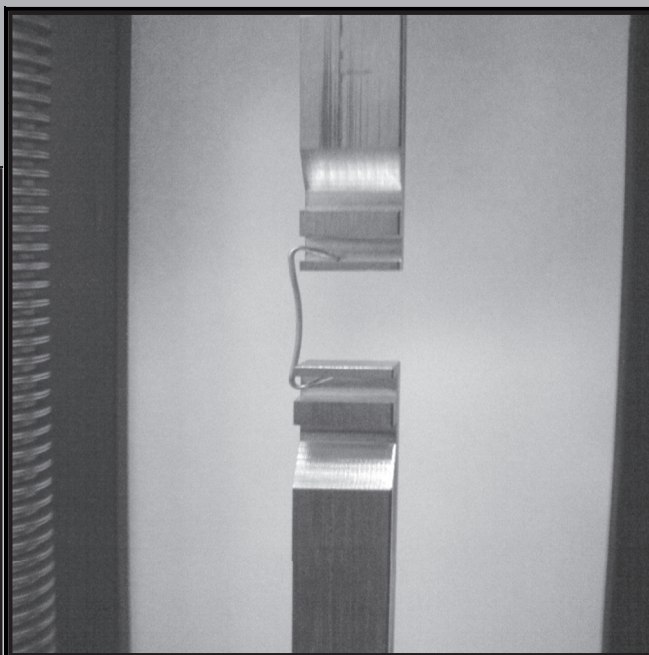
The tensile tests showed good mechanical properties of studied wires [7]. The stress-strain curves recorded during wire's loading and unloading during the cyclic tensile tests in the strain range up to about 8% are shown in FIG.1. The upper and lower stress plateau, which are visible on the presented curves, show the superelastic properties of the tested wires.

A characteristic loops of superelastic behavior of these wires were also observed on the force-deflection curves recorded by three-point bending tests. In FIGURE 2 the force changes during bending of the wires with different diameters on the supports which were located at a distance of 50 mm, are shown. On the presented curves there is visible the plateau of forces in wide range of deformation, as well as during loading and unloading. The level of generated forces during martensitic transformation induced by bending are strongly depended on the wire's diameter. For the wires chosen for preparing the superelastic staples for



RYS. 2. Krzywe "siła-ugięcie" zarejestrowane podczas trójpunktowego zginania drutów.

FIG. 2. The curves "force-deflection" recorded during three-point bending tests of wires.



RYS. 4. Klamra NiTi rozciągana w uchwycie mini maszyny wytrzymałościowej TM 2.

FIG. 4. NiTi staple tensioned in the supports of mini strength machine TM2.



cji zarówno podczas naprężania jak i odciążania. Wielkość generowanych sił podczas odwracalnej przemiany martenzytycznej indukowanej przez zginanie zależy od średnicy drutu. Dla drutów wybranych do przygotowania supersprężystych klamer do osteosyntezy oraz sprężyn do dystrakcji czaszki wielkość generowanych sił podczas odciążania mieściła się w zakresie od kilku do 15 N. Pożądana, stała siła oddziaływania podczas odciążania utrzymuje się w szerokim zakresie odkształceń 5-7 mm.

Drut zginany w uchwycie mini maszyny wytrzymałościowej pokazano na RYSUNKU 3. Zmiany sił podczas rozciągania supersprężystych klamer do osteosyntezy mierzone na tym samym stanowisku pomiarowym wyposażonym w odpowiednie uchwyty do zaczepienia klamer (RYS.4).

Przy projektowaniu supersprężystych implantów NiTi celowe jest wykorzystanie dostępnych programów, które umożliwiają modelowanie krzywych odkształcania metodą elementów skończonych. W tej pracy obliczenia wykonano w programie ADINA 8.7.3., w którym stosuje się metodę elementów skończonych dla modelowania materiałów z pamięcią kształtu. Zastosowany w programie model umożliwia symulowanie efektów supersprężystości i pamięci kształtu. W symulacji wykorzystano elementy typu 3-D solid do modelowania zginania belki. Na RYS 5a i 5b pokazano porównanie krzywych uzyskanych z obliczeń dla trójpunktowego zginania w porównaniu z eksperymentem.

Z wykresu histerezy można odczytać zmiany sił podczas przemiany martenzytycznej indukowanej naprężeniem i przemiany odwrotnej oraz całkowity odzysk kształtu. Jak

osteosynthese and springs for cranial distraction, the level of generated forces during unloading was between several and 15 N. The desirable constant force during unloading was kept at a wide range of deformation, about 5-7 mm.

FIGURE 3 shows the deformation three-point bending of the wire in the mini testing machine. Force changes during tensile of the superelastic staples for osteosynthesis were measured on the same test stand equipped with the suitable grips to attach the staples (FIG.4).

During designing the superelastic implants of NiTi it is advisable to use available softwares that which allows on modeling the deformation curves by the usage of finite element method. In this work the calculations were carried out with the ADINA System v. 8.7.3. using a shape memory alloy (SMA) material's model. This kind of model allows on simulation the superelastic and shape-memory effects in shape-memory alloys. In the simulations the 3-D solid elements were used for modeling the bending beam. The FIGURES 5a and 5b demonstrate comparison of calculation results with the experimental curves from three-point bending tests.

From the hysteresis results' graph the stress induced martensite transformation, the reverse transformation and the complete recovery of deformation can be seen. Moreover, on the basis of the following graph, there is reasonable agreement between experimental data and those obtained from Adina System.

This software enables also to obtain the austenite and martensite fractions in deformed material. FIGURE 6 shows

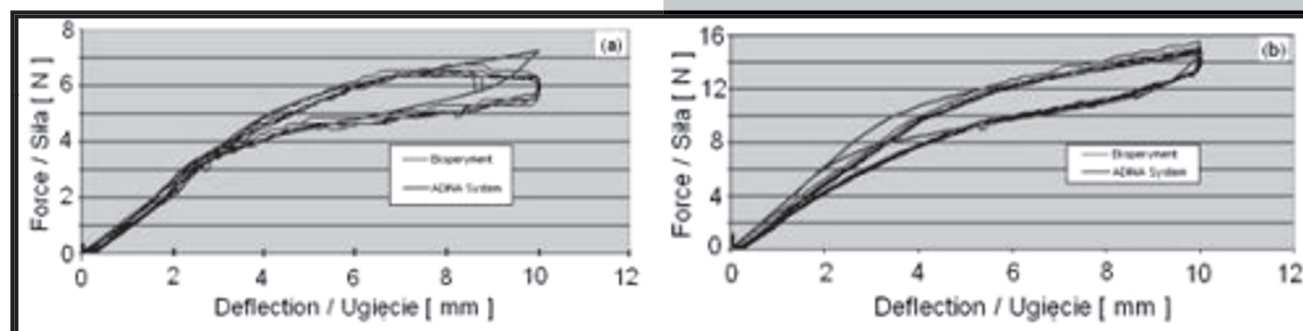


FIG. 5. Modelowe i eksperymentalne krzywe zginania drutów o średnicach 1,0 (a) and 1,2 mm (b).

FIG. 5. The model and experimental curves for NiTi wires of 1.0 mm (a) and 1.2 mm (b) diameters.

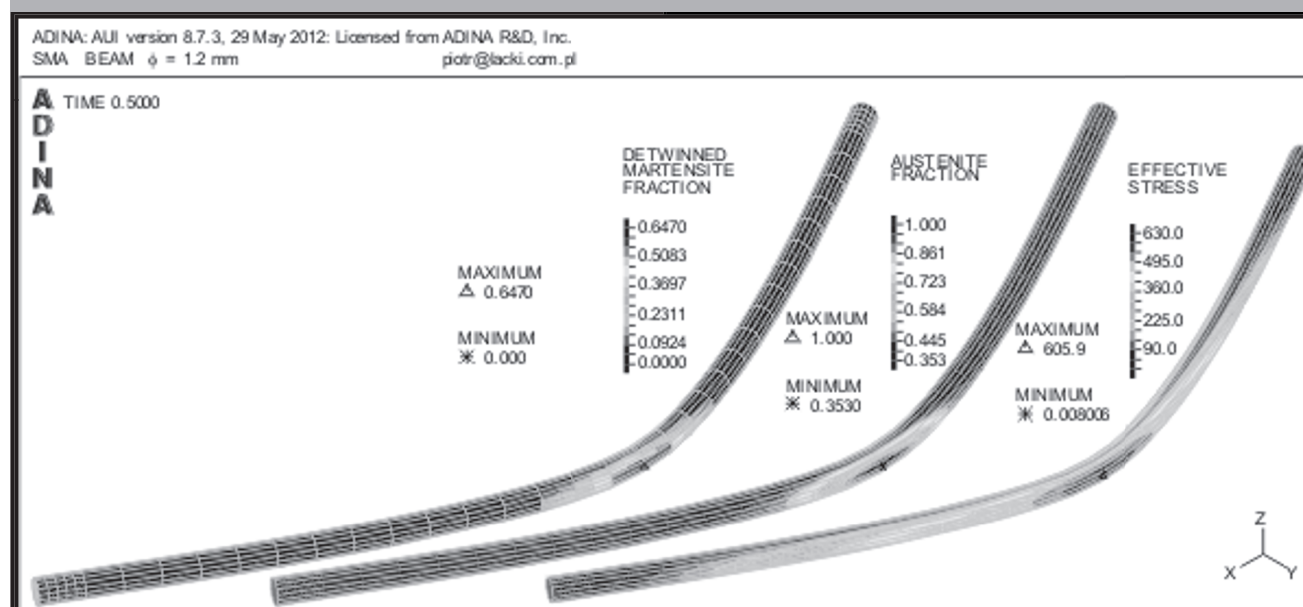


FIG. 6. Analiza MES trójpunktowego zginania drutu NiTi o średnicy 1,2 mm.

FIG. 6. Adina FEM analysis of NiTi wire with 1.2 mm diameter deformed by three-point bending test.



wynika z rysunku zachodzi rozsądna zgodność między wynikami obliczeń i danych eksperymentalnych.

Program umożliwia również określenie udziału austenitu i martenzytu w deformowanym materiale. RYSUNEK 6 pokazuje mapy frakcji martenzytu, frakcji austenitu i naprężeń zredukowanych przy maksymalnym ugięciu.

## Podsumowanie

Testy cyklicznego rozciągania i trójpunktowego zginania wykazały, że badane druty wykazują bardzo dobre własności supersprężyste. Wielkości sił generowanych podczas odciążania rozciąganych lub zginanych drutów zależą od ich średnicy. Siły oddziaływania drutów wybranych do przygotowania supersprężystych klamer do osteosyntezy oraz sprężyn do dystrykcji czaszki podczas odciążania po wygięciu mieściły się w zakresie od kilku do 15 N.

Symulowane krzywe zależności sił w funkcji strzałki ugięcia podczas obciążania i odciążania zginanych drutów są w dobrej korelacji z eksperymentalnymi krzywymi uzyskanymi w testach trójpunktowego zginania.

Uzyskane symulacje wykazały przydatność zastosowanego programu w modelowaniu supersprężystych właściwości drutów i implantów medycznych z pamięcią kształtu.

## Podziękowanie

*Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego Nr N N507 296339*

a band plot of the detwinned martensite fraction, austenite fraction and effective stress at maximum deflection.

## Summary

The cyclic tensile and three-point bending tests showed that the analyzed wires had very good superelastic properties. The values of forces generated during unloading of stretched or bend wires depended on their diameters. The impact of wires selected to prepare superelastic staples and springs for the skull distraction during unloading after bending were in the range from several to 15 N.

The simulation results for the loading and unloading force versus displacement were superimposed with the experimental results obtained from three-point bending tests.

This simulation showed the suitability of the numerical tools for modeling the superelasticity behavior of shape memory wires and medical implants.

## Acknowledgements

*This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, project no N N507 296339.*

## Piśmiennictwo

- [1] L. G. Machado, M. A. Savi., Brazilian J. of Medical and Biological Research 36 (2003) 683-691.
- [2] T. Duerig, A. Pelton, D. Stockel., Mat. Sci. Eng. A 273-275 (1999) 149-160.
- [3] M. Jędrusik-Pawłowska, Z. Lekston, J. Drugacz, T. Cieślík, M. Kromka-Szydek., Eng. of Biomat. 89-91, XII (2009) 79-82.
- [4] K. Kobus, M. Węgrzyn, Z. Lekston, H. Morawiec, J. Drugacz., J. Craniofac. Surg., 18 (3) (2007) 504-510.

## References

- [5] Y. Gillet, E. Patoor, and M. Berveiller., Journal De Physique IV, 5 (1995) C2-343-348.
- [6] F. B. Hatira, K. Saidane., J. of Biomaterials and Nanobiotechnology, 3 (2012) 61-69.
- [7] Z. Lekston, M. Jędrusik-Pawłowska, T. Cieślík, J. Drugacz., Eng. of Biomat., 89-91, XII (2009) 42-46.

## OCENA BIOAKTYWNOŚCI DWUFAZOWYCH MATERIAŁÓW IMPLANTACYJNYCH NA BAZIE FOSFORANÓW WAPNIA I PÓŁWODNEGO SIARCZANU (VI) WAPNIA

DOMINIKA SIEK\*, ANETA ZIMA, ZOFIA PASZKIEWICZ,  
ANNA ŚLÓSARCZYK

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

\*MAILTO: DOMINIKASIEK@GMAIL.COM

Fosforany wapnia (Calcium Phosphates - CaPs), stosowane z powodzeniem w regeneracji i rekonstrukcji tkanki kostnej, należą do grupy bioaktywnych materiałów zdolnych do bezpośredniego wiązania z kością. Interesującymi materiałami implantacyjnymi w postaci łatwo formujących się past cementowych są materiały dwufazowe na bazie HA (hydroksyapatytu) i  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -fosforanu trójwapniowego) oraz HA i CSH (półwodnego siarczanu (VI) wapnia). Wprowadzenie do struktury hydroksyapatytu różnych jonów np. srebra lub magnezu wpływa na zmianę jego właściwości fizykochemicznych jak również biologicznych. Połączenie hydroksyapatytu i półwodnego siarczanu (VI) wapnia (ten drugi stosowany jest w medycynie od wielu lat pod nazwą Plaster of Paris) prowadzi do wytworzenia materiałów o wysokiej poręczności chirurgicznej i kontrolowanej biodegradacji.

Celem pracy było wytworzenie oraz ocena potencjału bioaktywnego in vitro nowych materiałów kościotępczych typu cementowego na bazie CaPs i CSH. W skład wyjściowych proszków cementowych wchodziły: zsyntezowany na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki – AGH hydroksyapatyt dotowany srebrem (AgHA), węglanowy hydroksyapatyt dotowany magnezem (MgCHA),  $\alpha$ -TCP oraz CSH (Acros Organics). Jako płyny do zarabiania proszków cementowych zastosowano 1% roztwór chitozanu w 0,3% kwasie octowym oraz 0,75% roztwór metylocelulozy w 2%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Opracowane materiały implantacyjne poddano badaniom czasu wiązania, składu fazowego oraz wytrzymałości mechanicznej. Wytworzone preparaty kościotępcze przetrzymywano w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) przez okres 14 dni. Oznaczono zmiany stężenia pierwiastków: Ag, Ca, K, Mg, Na, S, P w płynie SBF w czasie trwania inkubacji wykorzystując technikę emisyjnej spektrometrii optycznej z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES). Przeprowadzono przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego obserwacje morfologii powierzchni uzyskanych materiałów po 7 i 14 dniach przetrzymywania ich w symulowanym płynie fizjologicznym. Badania SEM potwierdziły narastanie warstwy apatytowej na powierzchniach badanych preparatów, co wskazuje na ich charakter bioaktywny. Materiały implantacyjne, w których zastosowano półwodny siarczan (VI) wapnia, w związku z ich dużą podatnością do dezintegracji i biodegradacji, wykazywały odmienną morfologię powierzchni w porównaniu do preparatów, w których składnikiem wiążącym był  $\alpha$ -TCP. Wzrost zawartości: Ca i S w płynie SBF podczas trwania inkubacji badanych cementów z udziałem CSH po-

## EVALUATION OF BIOACTIVITY OF BIPHASIC IMPLANT MATERIALS BASED ON THE CALCIUM PHOSPHATES AND CALCIUM SULFATE HEMIHYDRATE

DOMINIKA SIEK\*, ANETA ZIMA, ZOFIA PASZKIEWICZ,  
ANNA ŚLÓSARCZYK

AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF  
MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, 30 MICKIEWICZA AVE, 30-  
050 KRAKÓW, POLAND

\*MAILTO: DOMINIKASIEK@GMAIL.COM

Calcium Phosphates (CaPs), used successfully in the regeneration and reconstruction of bone tissue, belong to the group of bioactive materials, capable to form a direct bond with natural bone. Biphasic materials (bone substitutes) based on HA (hydroxyapatite) and  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -tricalcium phosphate) as well as HA and CSH (calcium sulfate hemihydrate) in the form of easily shapeable cement pastes are very interesting implant materials. Introduction of different ions such as silver or magnesium into the structure of hydroxyapatite changes its physicochemical and biological properties. The combination of hydroxyapatite and calcium sulfate hemihydrate (the last one has been used in medicine for many years under the name of Plaster of Paris) leads to the fabrication of materials with high surgical handiness and controlled biodegradation.

The aim of this study was development and evaluation of the bioactive potential in vitro of the new cement type bone substitutes based on CaPs and CSH. Initial cement powders consisted of synthesized at the Faculty of Materials Science and Ceramics – AGH-UST silver doped hydroxyapatite (AgHA), magnesium doped carbonated hydroxyapatite (MgCHA),  $\alpha$ -TCP and CSH (Acros Organics). 1 wt.% chitosan solution in 0.3 wt.% acetic acid as well as 0.75 wt.% methylcellulose solution in 2 wt.%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  were applied as liquid phases. Setting time, phase composition and mechanical strength of developed implant materials were examined. Obtained bone substitutes were incubated in simulated body fluid (SBF) for 14 days. Changes in the concentration of the following elements: Ag, Ca, K, Mg, Na, S, P in SBF were determined by simultaneous inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Observations of the surface morphology of obtained materials after 7 and 14 days of incubation in simulated body fluid were carried out using scanning electron microscopy. SEM studies confirmed the growth of an apatite layer on the surfaces of tested materials, what indicates on their bioactivity. Implant materials based on calcium sulfate hemihydrate, due to their high susceptibility to disintegration and biodegradation, showed a different surface morphology compared to the materials based on  $\alpha$ -TCP as a binding agent. The increase in the content of Ca and S elements in SBF during the incubation of studied bone cements with CSH confirmed their gradual degradation in vitro.

**Keywords:** calcium phosphate, calcium sulfate, bioactivity

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 73-74]

twierdziło ich stopniową degradację *in vitro*.

**Słowa kluczowe:** fosforany wapnia, siarczan (VI) wapnia, bioaktywność  
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 73-74]

## Podziękowania

Praca badawcza współfinansowana ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Projekt nr: UDA-POIG.01.03.01-00-005/09.

## STERYLIZACJA RADIACYJNA BIORESORBOWALNYCH KOPOLIMERÓW ZAWIERAJĄCYCH LEK CYTOSTATYCZNY

MONIKA MUSIAŁ-KULIK<sup>1,2\*</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>,  
HENRYK JANECEK<sup>1</sup>, MAŁGORZATA PASTUSIAK<sup>1</sup>,  
JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLSKA AKADEMIA NAUK,  
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

<sup>2</sup>ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,

KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,  
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

\*MAILTO: MONIKA.MUSIAL-KULIK@CMPW-PAN.EDU.PL

## Streszczenie

Istnieje wiele metod sterylizacji wyrobów medycznych. Jednak najbardziej użytecznymi metodami sterylizacji syntetycznych, bioresorbowalnych polimerów wydają się być promieniowanie gamma oraz napromienianie wiązką elektronów (EB). Celem tej pracy było określenie wpływu wspomnianych metod na trzy rodzaje matryc – zawierających 3%, 5% paklitakselu oraz matryc bez leku. Badane matryce otrzymano z dwóch rodzajów poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) zsyntezowanych w 150°C (P1) oraz 120°C (P2). Nie zaobserwowano znaczących różnic w składzie komonomerów matryc sterylnych i niesterylnych, zawierających paklitaksel, jak i matryc bez leku. Spadek temperatury zeszklenia,  $T_g$ , wynikał ze zmniejszenia się średniej długości bloków laktydylowych oraz węglanowych, a także utraty  $M_n$  po procesie sterylizacji. Zauważalne były niewielkie różnice we właściwościach fizykochemicznych matryc napromienianych promieniowaniem gamma oraz wiązką elektronów. Otrzymane wyniki pokazują, iż lepszą metodą sterylizacji poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) wydaje się być napromienianie wiązką elektronów.

**Słowa kluczowe:** poli(L-laktydo-ko-węglan trimetyleny), paklitaksel, promieniowanie gamma, napromienianie wiązką elektronów, sterylizacja  
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 74-78]

## Acknowledgements

This work has been supported by the project No UDA-POIG.01.03.01-00-005/09 co-funded by European Union and Polish Ministry of Science and Higher Education.

## RADIATION STERILIZATION OF BIORESORBABLE COPOLYMERS WITH THE CYTOSTATIC DRUG

MONIKA MUSIAŁ-KULIK<sup>1,2\*</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>1</sup>,  
HENRYK JANECEK<sup>1</sup>, MAŁGORZATA PASTUSIAK<sup>1</sup>,  
JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON AND MATERIALS,  
34 M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

<sup>2</sup>MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

\*MAILTO: MONIKA.MUSIAL-KULIK@CMPW-PAN.EDU.PL

## Abstract

There are many methods of sterilization approved for medical devices. However, the most usable methods of synthetic, bioresorbable polymers sterilization seem to be gamma radiation and electron beam irradiation (EB). The aim of this work was to determine the impact of mentioned methods on three types of matrices - containing 3%, 5% of paclitaxel and also drug free matrices. The studied matrices were obtained from two poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) synthesized at 150°C (P1) and 120°C (P2). No significant differences of comonomers' composition were observed in sterile and non-sterile matrices containing paclitaxel as well as drug free matrices. The decrease of the glass transition temperature,  $T_g$ , resulted from decrease of the lactidyl and carbonate units' content and the  $M_n$  loss after radiation. Small dissimilarities of physicochemical features between gamma and EB radiated matrices were noticeable. Thus, the obtained data showed that better method of sterilization poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) seems to be electron beam radiation.

**Keywords:** poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate), paclitaxel, gamma irradiation, electron beam radiation, sterilization  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 74-78]



## Wprowadzenie

Paklitaksel (PTX), znany od około 40 lat, posiada wiele mechanizmów działania. Zatrzymuje mitozę komórek mięsni gładkich ścian naczyń krwionośnych (SMCs) poprzez łączenie się z  $\beta$ -tubuliną, przez co stabilizuje mikrotubule, ale może też wpływać na komórki układu immunologicznego (komórki 'naturalni zabójcy', komórki dendrytyczne, makrofagi). [1] Paklitaksel wykazuje antyneoplastyczne oraz antyrestenotyczne właściwości i dlatego hamuje proliferację oraz migrację SMCs. [2]

Postęp medycyny i farmacji przyczynia się do poszukiwania nowych zastosowań dla materiałów polimerowych, które składają się głównie z laktydu, glikolidu, węglanu trimetyleny oraz  $\epsilon$ -kaprolaktonu. Są one szeroko stosowane jako nici chirurgiczne, zszywki chirurgiczne, śruby kostne, skafoldy w inżynierii tkankowej czy systemy uwalniania leków. [3] Systemy kontrolowanego uwalniania paklitakselu mogą służyć jako całkowicie bioresorbowalne stenty tętnic wieńcowych oraz przeciwnowotworowe implanty.

Istnieje wiele metod sterylizacji wyrobów medycznych m.in. cieplne (suche gorące powietrze lub gorąca para wodna np. autoklawowanie), chemiczne (np. tlenek etylenu), ciśnieniowe oraz napromienianie (promieniowanie gamma, promieniowanie X, wiązka elektronów, wiązka jonów). [4] To zrozumiałe, że wyroby otrzymane z bioresorbowalnych polimerów nie powinny być sterylizowane w wysokiej temperaturze ze względu na obniżenie się ich mechanicznych właściwości. Tlenek etylenu również nie jest zalecany ze względu na swoje pozostałości. Najbardziej użytecznymi dla syntetycznych polimerów wydają się być metody sterylizacji wykorzystujące promieniowanie gamma oraz wiązkę elektronów (EB).

## Materiały i metody

Dwa rodzaje poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetyleny) (PLATMC) zostały zsyntezowane w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu.  $Zr(Acac)_4$  użyto jako niskotoksycznego inicjatora kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia. Reakcja była przeprowadzona w 150°C (P1) oraz w 120°C (P2), stosunek inicjatora do monomerów (I/M) wynosił 1/1000. Paklitaksel (PTX) zakupiono w LC Laboratories®.

Odpowiednią ilość kopolimeru i paklitakselu rozpuszczono osobno w chlorku metylenu (DCM). Następnie te dwa roztwory mieszało, odgazowano pod zmniejszonym ciśnieniem i wylano na teflonowe formy. Filmy wysuszono w temperaturze pokojowej i pod zmniejszonym ciśnieniem. 10mm krążki zostały wycięte z filmów. Matryce bez leku zostały również przygotowane, zgodnie z procedurą opisaną powyżej.

Każdy rodzaj matrycy: 0%, 3% oraz 5% PTX był hermeticznie zamknięty i napromieniany przy użyciu wiązki elektronów oraz promieniowania gamma.

Próbki sterylizowano wiązką wysokoenergetycznych elektronów o energii 10MeV generowaną przez akcelerator elektronowy.  $^{60}Co$  stanowił źródło promieniowania gamma, moc dawki wynosiła 8,28kGy/h. Oba źródła promieniowania dostarczyły dawkę 25kGy.

Sterylnie i niesterylne matryce zbadano z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz chromatografii żelowej (GPC).

Chromatografia żelowa (GPC, Physics SP 8800) posłużyła do zbadania liczbowo średnich mas cząsteczkowych ( $M_n$ ) oraz rozrzutu mas cząsteczkowych (D). Rozpuszczalnikiem był chloroform.

## Introduction

Paclitaxel (PTX), well known for almost 40 years, possess many sites of action. It inhibits mitosis of smooth muscle cells through binding the  $\beta$ -tubulin and though stabilizes microtubules but can also influence the immune cells (natural killer cells, dendritic cells, macrophages). [1] Paclitaxel has anti-neoplastic as well as anti-restenotic abilities for as much it inhibits smooth muscle cells proliferation and migration. [2]

Advance in medicine and pharmacy contributes to search new applications of polymer materials, that are mostly composed of lactide, glycolide, trimethylene carbonate and  $\epsilon$ -caprolactone. They are widely used as sutures, staples, bone screws, scaffolds in tissue engineering or drug delivery systems. [3] Controlled delivery systems of paclitaxel may serve as totally bioresorbable coronary artery stents or anticancer implants.

There are many methods of sterilization approved for medical devices as heat (dry heat or moist heat such as autoclaving), chemicals (e.g. ethylene oxide), pressure or irradiation (gamma rays, X rays, electron beam, ion beams). [4] It is understood, that devices made of bioresorbable polymers should not be sterilized at high temperature because of decrease of their mechanical properties. Ethylene oxide is also not recommended due to its residues. [5] The most usable methods for synthetic polymers sterilization seem to be gamma radiation and electron beam irradiation (EB).

## Materials and methods

Two types of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (PLATMC) were synthesized at the Centre of Polymer and Carbon Materials, PAScs in Zabrze.  $Zr(Acac)_4$  was used as a low toxic initiator of the ring-opening copolymerization. The reaction was performed at 150°C (P1) and 120°C (P2) with the initiator to monomer molar ratio (I/M) of 1/1000. Paclitaxel (PTX) was purchased from LC Laboratories®.

Appropriate amount of copolymer and paclitaxel were dissolved separately in methylene chloride (DCM). Then the two solutions were mixed, degassed under reduced pressure and cast on teflon forms. The films were dried at ambient temperature and under reduced pressure afterwards. 10mm discs were cut from the films. Drug-free matrices were also prepared, according to the procedure described above.

Each kind of matrix: 0%, 3% and 5% of PTX was hermetically sealed and irradiated with the use of electron beam as well as gamma rays.

The samples were sterilized by an electron beam with the accelerating voltage of 10MeV generated in the electron accelerator.  $^{60}Co$  constituted the source of gamma rays and the dose rate equalled 8,28kGy/h. Both sources of radiation delivered the radiation dose of 25kGy.

Sterilized and non-sterilized matrices were studied by means of nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry (DSC) and gel permeation chromatography (GPC).

Gel permeation chromatograph (GPC, Physics SP 8800) was employed to study the number average molecular weight and ( $M_n$ ) and molecular mass dispersity (D). Chloroform was used as the solvent.

Thermal properties such as glass transition temperature,  $T_g$ , melting temperature,  $T_m$ , and melting enthalpy,  $\Delta H_m$  were estimated with the use of differential scanning calorimeter (TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). The matrices were scanned twice in the range of -50°C to 200°C (heating rate of 20°C/min). The samples were quenched to -100°C in liquid nitrogen in order to obtain amorphous

Termiczne właściwości, takie jak temperatura zeszklenia,  $T_g$ , temperatura topnienia,  $T_m$  oraz entalpia topnienia,  $\Delta H_m$  oznaczono za pomocą skaningowego kalorymetru różnicowego (TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). Matryce skanowano dwukrotnie w zakresie -50 do 200°C (szybkość ogrzewania 20°C/min). Próbki szybko schładzano do -100°C w ciekłym azocie w celu otrzymania amorficznych kopolimerów. DSC kalibrowano standardami galu i indu.  $T_m$  oraz  $\Delta H_m$  wyznaczono z pierwszego skanu, natomiast  $T_g$  z drugiego.

Zmiany w składzie komonomerów, średniej długości bloków laktydylowych ( $l_{LL}$ ) i węglanowych ( $l_T$ ) określono na podstawie widm  $^1H$  NMR zarejestrowanych przez nadprzewodzący spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej rozdzielczości – 600MHz (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker).  $CDCl_3$  był rozpuszczalnikiem, tetrametylosilan (TMS) – standard wewnętrzny.

## Wyniki i dyskusja

Celem niniejszej pracy było porównanie wpływu jonizacyjnych metod sterylizacji na bioresorbowalne matryce zawierające paklitaksel. Dwa rodzaje poli(L-laktydo-ko-węglanu trimetylenowego) (PLATMC) zsyntezowane w różnych temperaturach: 150°C - P1 (75LA:25TMC) oraz w 120°C - P2 (74LA:26TMC) wykorzystano do przygotowania matryc z 3% oraz 5% paklitakselu, a także matryc niezawierających leku. Oba kopolimery składały się z laktydylowych, jak i węglanowych jednostek, lecz różniły się właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak liczbowo średnia masa cząsteczkowa ( $M_n$ ), rozrzut mas cząsteczkowych ( $D$ ), temperatura zeszklenia,  $T_g$ , temperatura topnienia,  $T_m$ . Kopolimery posiadały niemalże identyczny stosunek komonomerów oraz średnią długość bloków węglanowych, podczas gdy średnia długość bloków laktydylowych była odmienna. Dowiedziono, iż mikrostruktura łańcucha ma wpływ na degradację hydrolytyczną polimerów, ale również na profil uwalniania leku. [6,7]

RYS.1. i 2. prezentują liczbowo średnie masy cząsteczkowe ( $M_n$ ) każdego typu matrycy przed i po procesie sterylizacji za pomocą wiązki elektronów oraz promieniowania gamma. Wszystkie badane materiały wykazywały spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej, bez względu na zawartość paklitakselu i metodę napromieniania. Jakkolwiek, nie zaobserwowano znaczących zmian w rozrzucie mas cząsteczkowych ( $D$ ). Matryce napromienia-

copolymers. DSC was calibrated using high purity gallium and indium standards.  $T_m$  and  $\Delta H_m$  was obtained from the first scan while  $T_g$  from the second scan.

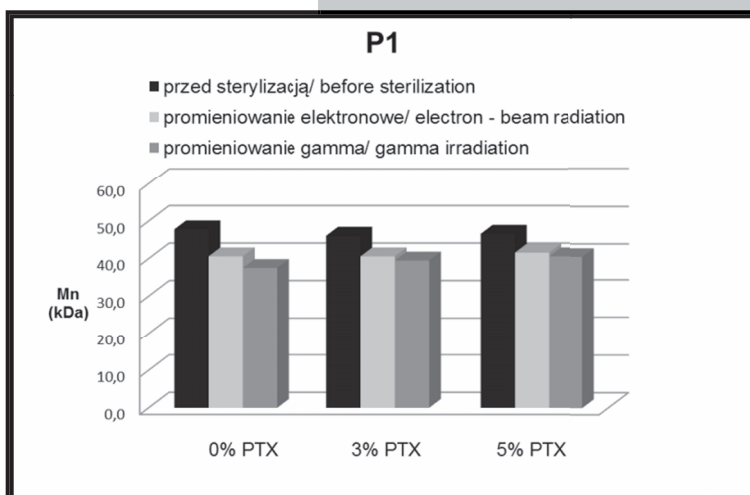
The changes of copolymers composition, the average length of lactidyl ( $l_{LL}$ ) and carbonate ( $l_T$ ) units were determined from  $^1H$  NMR spectra recorded at superconducting high-resolution nuclear magnetic resonance spectrometer – 600 MHz (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker).  $CDCl_3$  was the solvent, tetrametylsilane (TMS) – the internal standard.

## Results and discussions

The aim of this study was to compare the influence of ionizing methods of sterilization on paclitaxel-containing bioresorbable matrices. Two kinds of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) (PLATMC) synthesized at different temperatures: 150°C – P1 (75LA:25TMC) and 120°C – P2 (74LA:26TMC) were applied to prepare matrices

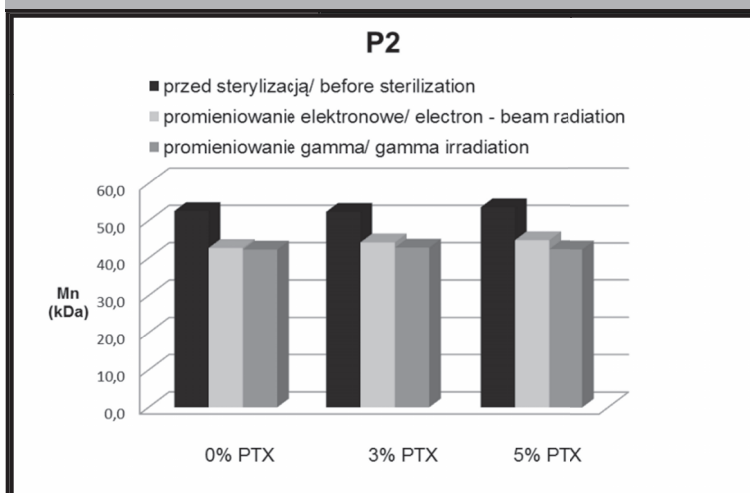
with 3% and 5% of PTX as well as drug free matrices. Both copolymers consisted of lactidyl and carbonate units but differed in physicochemical properties such as the average molar mass, dispersity index, glass transition temperature,  $T_g$  and melting temperature  $T_m$ . The copolymers characterized almost the same comonomeric ratio and the average length of carbonate units before irradiation, while they varied in the average lengths of lactidyl units. It was confirmed that chain microstructure has an impact on hydrolytic degradation of polymers but also on drug release profile. [6,7]

FIGURES 1. and 2. present changes of the number average molecular weight ( $M_n$ ) of each kind of matrix before and after sterilization with the use of accelerated electrons and gamma rays. All of the studied materials showed decrease of the number average molecular weight, regardless paclitaxel content



**RYS. 1.** Porównanie średnich liczbowo mas cząsteczkowych ( $M_n$ ) matryc P1 (0%, 3% oraz 5% PTX) niesterylnych oraz poddanych sterylizacji wiązką elektronów i promieniowaniu gamma.

**FIG. 1.** Comparison of the number average molecular weight ( $M_n$ ) of non-sterile P1 matrices (0%, 3% and 5% PTX) and matrices after electron beam radiation as well as gamma radiation.



**RYS. 2.** Porównanie średnich liczbowo mas cząsteczkowych ( $M_n$ ) matryc P2 (0%, 3% oraz 5% PTX) niesterylnych oraz poddanych sterylizacji wiązką elektronów i promieniowaniu gamma.

**FIG.2 .** Comparison of the number average molecular weight ( $M_n$ ) of non-sterile P2 matrices (0%, 3% and 5% PTX) and matrices after electron beam radiation as well as gamma radiation.

ne promieniami gamma charakteryzowały się nieznacznie niższymi masami cząsteczkowymi niż matryce sterylizowane EB. Wyższą utratę  $M_n$  obserwowano w przypadku matrycy P2 (74LA:26TMC). Spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej może wynikać z degradacji głównych łańcuchów spowodowanej radiacją [8]. Wszystkie matryce były hermetycznie zamknięte, dlatego też wyklucza się wpływ rodników tlenowych na degradację. Ponadto, spadek  $M_n$  matrycy bez paklitakselu był nieco wyższy niż w matrycach z lekiem.

Analizy DSC ujawniły, iż matryce wykonane z P1 oraz P2 były semikrystaliczne, ponieważ wszystkie wykazywały endotermie topnienia i temperatury zeszklenia. Termiczna charakterystyka sterylnych i niesterylnych matrycy prezentowana jest w TABELI 1. Jako rezultat utraty  $M_n$ , napromieniane matryce miały nieco niższe  $T_g$ , niż matryce przed napromienianiem. Ten efekt był bardziej widoczny w matrycach przygotowanych z P2. Temperatury topnienia matrycy P1 oraz P2 były niższe po procesie radiacji. Całkowita  $\Delta H_m$  wzrosła w matrycach P2 zawierających paklitaksel po obu typach promieniowania, podczas gdy spośród matrycy P1 najwyższą  $\Delta H_m$  obserwowano w matrycach napromienianych promieniami gamma (wyników nie pokazano), bez względu na zawartość leku.

Widma  $^1H$  NMR nie pokazały różnic w udziale jednostek komonomerycznych

między matrycami P1 przed i po sterylizacji. Napromieniane matryce P2 wyróżniały się wzrostem ilości jednostek laktydylowych i ubytkiem jednostek węglanowych, wartości te były nieznacznie wyższe dla matrycy po sterylizacji promieniowaniem gamma. Matryce P1 i P2 cechowały się spadkiem średniej długości bloków laktydylowych  $l_{LL}^e$  oraz węglanowych  $l_T^e$  (TABELA 2.). Średnie długości bloków były

mniejsze po promieniowaniu gamma, co korespondowało z ubytkiem masy cząsteczkowej. Doniesiono, że promieniowanie gamma powoduje rozerwanie łańcuchów, przez co wpływa również na fizykochemiczne właściwości napromienianych polimerów. [9] Matryce zawierające lek były bardziej wrażliwe na radiację ponieważ średnie długości bloków  $l_{LL}^e$  i  $l_T^e$  były mniejsze niż matrycy bez leku. Jakkolwiek, cząsteczka leku nie uległa zmianie w czasie sterylizacji.

Nie obserwowano znaczących różnic w składzie jednostek komonomerycznych matrycy sterylnych i niesterylnych, zawierających lek i matrycy bez leku. Obniżenie się

and methods of radiation. However, no significant changes of dispersity index (D) were observed. The gamma irradiated matrices characterized slightly lower molecular mass than matrices sterilized with EB. Higher loss of molecular mass observed in case of P2 matrices (74LA:26TMC). The decrease of the average molecular mass can result from main-chains degradation caused by the radiation [8]. All of the matrices were hermetically packed thus the impact of free oxygen radicals on chain degradation was excluded. [9] Furthermore, decrease of  $M_n$  of matrices without paclitaxel was slightly higher than drug-containing matrices.

DSC analysis showed that P1 and P2 matrices were semicrystalline since all of them exhibited melting endotherms and glass transition temperatures. Thermal characteristic of sterile and non-sterile matrices is presented in TABLE 1. As a result of  $M_n$  decrease, the radiated matrices showed slightly lower  $T_g$  than non-radiated materials. This effect was more significant in the case of matrices obtained from P2. The melting temperatures of P1 and P2 matrices were lower after irradiation. Total  $\Delta H_m$  of P2 matrices increased in drug-free matrices and decreased in matrices with paclitaxel after both types of radiation, while among P1 matrices the highest  $\Delta H_m$  were observed in gamma irradiated matrices (data not shown), regardless drug loading.

The  $^1H$  NMR spectra revealed no differences in comonomer molar ratio between all of the P1 matrices before and after sterilization. The P2 matrices distinguished lactidyl units content increase of and carbonate units content decrease after radiation and these values were slightly higher for matrices irradiated with gamma rays. P1 and P2 matrices showed decrease of the average

length of lactidyl units  $l_{LL}^e$  after sterilization as well as the average length of carbonate units  $l_T^e$  (TABLE 2). The average block lengths were more reduced after gamma irradiation, which corresponded to the molecular mass loss of the studied matrices. It has been reported that gamma rays induce chain-scission and thus influence physicochemical properties of radiated polymers. [9] Drug-loading matrices were more susceptible to radiation since the average block lengths were lower than  $l_{LL}^e$  and  $l_T^e$  of drug free matrices. However, the drug molecule did not changed after sterilization.

No significant differences

Rodzaj matrycy/ Type of matrice	Przed sterylizacją/ Before sterilization		Po sterylizacji/ After sterilization					
			EB		gamma			
	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)
P1 0% PTX	44,0	94,0	43,7	90,0	43,3	91,0		
	43,4	101,0	42,0	93,0	42,4	86,0		
	44,4	111,0	43,9	93,9	43,2	101,9		
P2 0% PTX	45,0	148,0	43,0	147,0	42,5	147,0	158,1	
	46,5	143,0	44,2	143,9	44,0	147,6	158,0	
	46,2	140,8	44,0	156,3	45,8	142,0	157,0	

**TABELA 1. Termiczna charakterystyka sterylnych i niesterylnych matrycy ( $T_g$  – temperatura zeszklenia,  $T_m$  – temperatura topnienia).**

**TABLE 1. Thermal characteristic of sterile and non-sterile matrices ( $T_g$  – glass-transition temperature,  $T_m$  – melting temperature)**

**$T_g$  – drugi skan DSC/second DSC scan;  $T_m$  – pierwszy skan DSC/first DSC scan.**

Rodzaj matrycy/ Type of matrice	Przed sterylizacją/ Before sterilization		Po sterylizacji/ After sterilization					
			EB		gamma			
	$l_{LL}^e$	$l_T^e$	$l_{LL}^e$	$l_T^e$	$l_{LL}^e$	$l_T^e$	$l_{LL}^e$	$l_T^e$
P1 0% PTX	3,11	1,04	2,60	0,87	2,42	0,81		
	3,12	1,04	2,05	0,68	2,00	0,67		
	3,11	1,04	2,15	0,72	2,10	0,70		
P2 0% PTX	3,65	1,28	3,62	1,27	3,42	1,14		
	3,39	1,19	1,80	0,60	1,56	0,49		
	3,42	1,20	1,99	0,66	1,43	0,45		

**TABELA 2. Średnie długości bloków laktydylowych i węglanowych ( $l_{LL}^e$  i  $l_{TMC}^e$ ) przed i po sterylizacji matrycy P1 oraz P2.**

**TABLE 2. The average lengths of lactidyl and carbonate units ( $l_{LL}^e$  and  $l_{TMC}^e$ ) before and after sterilization of P1 and P2 matrices.**



temperatury zeszklenia,  $T_g$ , wynikało ze spadku średniej długości bloków laktydylowych i węglanowych oraz utraty  $M_n$  po procesie sterylizacji. Otrzymane wyniki pokazują, iż oba kopolimery były bardziej odporne na radiację wiązką elektronową. Mimo to, zauważalne były niewielkie różnice we właściwościach fizykochemicznych matryc sterylizowanych promieniami gamma i EB.

## Wnioski

Dwa rodzaje kopolimerów wykorzystano do otrzymania matryc z 3% i 5% zawartością paklitakselu oraz matryc bez leku, które sterylizowano z użyciem wiązki elektronów oraz promieniowania gama. Dawka promieniowania wynosiła 25kGy. Wiązka elektronów oraz promieniowanie gama wpłynęły na średnią liczbowo masę cząsteczkową ( $M_n$ ), właściwości termiczne oraz średnie długości bloków laktydylowych i węglanowych ( $I_{LL}^e$ ,  $I_{CT}^e$ ). Obie metody sterylizacji spowodowały spadek wspomnianych parametrów. Mało istotne zmiany w stosunku komonomerów obserwowano jedynie w przypadku matryc P2. Zawartość paklitakselu spowodowała nieznacznie mniejszy ubytek masy cząsteczkowej i większy spadek średniej długości jednostek laktydylowych ( $I_{LL}^e$ ) w porównaniu z matrycami bez leku. Uzyskane wyniki pokazują, iż lepszą metodą sterylizacji poli(L-laktydo-kowęglanu trimetyleny) wydaje się być napromienianie wiązką elektronową.

Przeprowadzone badania wskazują na konieczność wyboru odpowiedniej metody sterylizacji materiałów polimerowych, ponieważ podczas procesu sterylizacji może dojść do zmian w ich właściwościach fizykochemicznych. To z kolei determinuje zmiany w procesie degradacji i pośrednio wpływa na profil uwalniania substancji leczniczej.

## Podziękowania

Pracę zrealizowano w ramach badań finansowanych przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (KNW-1-027/D/2/0) oraz Narodowe Centrum Nauki (NN 405 682 340).

of comonomers' composition were observed in sterile and non-sterile matrices containing paclitaxel as well as drug free matrices. The decrease of the glass transition temperature,  $T_g$ , resulted from decrease of the average lactidyl and carbonate block length and the  $M_n$  loss after radiation. The obtained data showed that both copolymers were more resistant to EB radiation. Nevertheless, small dissimilarities of physicochemical features between gamma and EB radiated matrices were noticeable.

## Conclusions

Two kinds of copolymers were used to obtain matrices with 3%, 5% of PTX and drug free matrices that were sterilized with the use of electron beam as well as gamma rays. The radiation dose was 25kGy. Electron beam radiation and gamma rays influenced the number average molecular weight ( $M_n$ ), thermal properties and the average length of lactidyl and carbonate units ( $I_{LL}^e$ ,  $I_{CT}^e$ ). Both methods of sterilization caused decrease in all of the mentioned parameters. The insignificant changes of comonomeric ratios were observed only in P2 matrices. Paclitaxel content caused less significant molecular mass decrease and higher decrease of the average length of lactidyl units ( $I_{LL}^e$ ) in comparison to matrices without drug. Obtained data showed that better method of sterilization poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) seems to be electron beam radiation.

Research has indicated the necessity of selecting an appropriate method of sterilization of polymeric materials, since during the sterilization process some changes in their physicochemical properties may occur. This in turn determines the changes in the degradation process and indirectly affects the drug release profile.

## Acknowledgments

This study has been financially supported by Medical University of Silesia in Katowice (Grant No: KNW-1-027/D/2/0) and National Science Centre (Grant No: NN 405 682 340).

## Piśmiennictwo

- [1] Javeed A., Asharf M., Riaz A., Ghafoor A., Afzal S., Mukhtar M. M.: Paclitaxel and immune system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38 (2009) 283-290.
- [2] Kraitzer A., Kloog Y., Zilberman M.: Approaches for prevention of restenosis, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 85B (2008) 583-603.
- [3] Nair L. S., Laurencin C.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- [4] Edlund U., Albertsson A.-C.: Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. *Advances in Polymer Science* 2002 (157) 67-112.
- [5] Mendes G. C. C., Brandão T. R. S., Silva C. L. M.: Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review, *American Journal of Infection Control* 35 (2007) 574-58.
- [6] Hua J., Gębarowska K., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Wei J., Li S.: Influence of chain microstructure on the hydrolytic degradation of copolymers from 1,3-trimethylene carbonate and L-lactide, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009) 3869-3879.

## References

- [7] Jelonek K., Kasperczyk J., Li S., Dobrzyński P., Jarząbek B.: Controlled poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) delivery system of cyclosporine A and rapamycin – the effect of copolymer chain microstructure on drug release rate, *International Journal of Pharmaceutics* 414 (2011) 203-209.
- [8] Loo S. C. J., Ooi C. P., Boey F. C. F.: Radiation effects on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA), *Polymer Degradation and Stability* 83 (2004) 259-265.
- [9] Montanari L., Cilurzo F., Valvo L., et al.: Gamma irradiation effect on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam, *Journal of Controlled Release* 75 (2001) 317-330.

# WYTWARZANIE POROWATYCH RUSZTOWAŃ Z POLI(3-HYDROKSYSYMAŚLANU-KO-3-HYDROKSYWALERIANU) ZA POMOCĄ TECHNIKI SZYBKIEGO PROTOTYPOWANIA

ŻANETA KUBLIK, JOANNA IDASZEK, WOJCIECH ŚWIESZKOWSKI\*

POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WARSZAWA, POLSKA

\*MAILTO: WOJCIECH.SWIESZKOWSKI@INMAT.PW.EDU.PL

## Streszczenie

*Poli(3-hydroksysymaślan-ko-3-hydroksywalerian) (PHBV) jest polimerem biodegradowalnym należącym do grupy poliestrów alifatycznych. Polimer ten jest termoplastem o wysokim wskaźniku szybkości płynięcia, co utrudnia jego przetwarzanie za pomocą wytłaczania. W przedstawionych badaniach wytworzono mieszkankę PHBV z PLGA oraz wyznaczono jej masowy wskaźnik szybkości płynięcia (MFR). Dodatek PLGA obniżył MFR, co umożliwiło wytworzenie trójwymiarowego rusztowania za pomocą techniki szybkiego prototypowania.*

**Słowa kluczowe:** PHBV, PLGA, wskaźnik szybkości płynięcia, inżynieria tkankowa, technika szybkiego prototypowania

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 79-81]

## Wprowadzenie

Użycie biodegradowalnych rusztowań do uzupełniania ubytków tkanek pozwala uniknąć reoperacji związanej z usuwaniem tradycyjnych implantów. Poli(3-hydroksysymaślan-ko-3-hydroksywalerian) (PHBV) jest biopolimerem cieszącym się obecnie dużym zainteresowaniem jako potencjalny materiał do wytwarzania bioresorbowalnych rusztowań do inżynierii tkankowej. PHBV jest biogodny z tkanką kostną, chrzęstną, krwią oraz z wieloma typami komórek (np. fibroblastami, komórkami śródbłonnka, hepatocytami) [1,2]. Dodatkowo produkty rozkładu PHBV mają pH wyższe od produktów hydrolizy np. poliglikolidu (PGA). Mniej kwaśne pH produktów degradacji zmniejsza ryzyko wystąpienia stanów zapalnych w miejscach uzupełnianych ubytków. PHBV, ze względu na tę zaletę oraz dobre właściwości mechaniczne, wydaje się być odpowiednim materiałem do regeneracji tkanki kostnej. PHBV po stopieniu wykazuje wysoką płynność, przez co jest trudny do przetwarzania metodą wytłaczania [3].

Celem prezentowanych badań było zmodyfikowanie PHBV w sposób pozwalający na wytworzenie porowatych rusztowań za pomocą jednej z technik szybkiego prototypowania, tzw. osadzania topionego materiału (ang. FDM - Fused Deposition Modeling).

## Materiały i metody

Do badań użyto następujących materiałów: Poli(3-hydroksysymaślan-ko-3-hydroksywalerian) (PHBV, zawartość HV 12% wagowych, Sigma-Aldrich, USA) i poli(L-laktyd-ko-glikolid) (PLGA, Resomer 855S, zawartość GA 15% molarowych, lepkość 2.5 - 3.5 dl/g, Boehringer Ingelheim, Niemcy). Chlorek metylenu (cz.d.a.; Chempur; Polska).

# FABRICATION OF POROUS POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) SCAFFOLDS USING A RAPID PROTOTYPING TECHNIQUE

ŻANETA KUBLIK, JOANNA IDASZEK, WOJCIECH ŚWIESZKOWSKI\*

WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, WARSAW, POLAND

\*MAILTO: WOJCIECH.SWIESZKOWSKI@INMAT.PW.EDU.PL

## Abstract

*Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) is a biodegradable polymer which belongs to a group of aliphatic polyesters. PHBV is a thermoplast with a relatively high melt flow index. This property makes it difficult to process by means of extrusion. In the present study we have prepared PHBV blended with PLGA and determined its melt flow rate (MFR). The addition of PLGA decreased MFR, which enabled fabrication of three-dimensional scaffold by means of Fused Deposition Modeling (FDM).*

**Keywords:** PHBV, PLGA, melt flow index, MFR, tissue engineering, rapid prototyping  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 79-81]

## Introduction

The use of biodegradable scaffolds to treat tissue losses allows to avoid removal of a non-biodegradable implant. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) is a biopolymer, which has been widely investigated as a potential material for fabrication of bioresorbable scaffolds for tissue engineering. PHBV is biocompatible with bone, cartilage, blood and various cells, such like fibroblasts, endothelium cells or hepatocyte [1,2]. In addition, degradation products of PHBV have a pH higher than the hydrolysis products of polymers like e.g. polyglycolide (PGA). Less acidic pH of the degradation products reduces risk of an inflammation in supplemented tissue losses [3]. PHBV, due to abovementioned advantages, as well as its good mechanical properties, seems to be a suitable material for bone tissue regeneration. The molten PHBV exhibits relatively high fluidity, which makes it difficult to process by means of an extrusion [4].

The aim of present study was to modify PHBV to enable fabrication of 3D porous scaffolds using one of the rapid prototyping techniques, namely Fused Deposition Modeling (FDM).

## Materials and methods

The following materials were used: Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV, HV content of 12 wt%, Sigma-Aldrich, USA); poly (L-lactide-co-glycolide) (PLGA, Resomer 855S, GA content of 15 mol%, inherent viscosity of 2.5 - 3.5 dl / g, (Boehringer Ingelheim, Germany); methylene chloride (Chempur, Poland).

The polymeric blend was prepared by solvent casting technique. The PHBV and PLGA were dissolved in methylene chloride and then cast into a Petri dish. The resulting films were dried in a vacuum dryer and cut into small pieces. The such prepared blend was used for measurements of the MFR and fabrication of the scaffolds.

**TABELA 1. Warunki wyznaczania masowego wskaźnika szybkości płynięcia.**

**TABLE 1. Conditions of determination of the mass melt flow index.**

Material / Material	PHBV	PHBV/ PLGA	PLGA
Temperatura pomiaru / Temperature of the test [°C]	165	165	190
Czas grzania wstępnego próbki bez obciążenia / Time of pre-heating of a sample without load [s]	300	180	180
Czas grzania wstępnego próbki z obciążeniem / Time of pre-heating of a sample with load (2.16kg) [s]	0	120	120
Obciążenie podczas pomiaru / Load during the measurement [kg]	2,16	2,16	2,16
Wskaźnik szybkości płynięcia / Mass Flow Rate [g/10min]	19,58	6,00	5,65

Mieszanka była przygotowana przez odlanie z roztworu. PHBV i PLGA rozpuszczono w chlorku metylenu a następnie wylano na szalkę Petriego. Powstałe filmy, po ich wysuszeniu w suszarce próżniowej (40°C, 100mbar), pocięto i użyto do badań właściwości reologicznych i wytwarzania rusztowań.

Masowy wskaźnik szybkości (MFR) płynięcia wyznaczono na plastometrze Melt Flow Modular Line (Ceast, Italy). Warunki wyznaczania MFR dla poszczególnych materiałów przedstawiono w TABELI 1. Właściwy pomiar polegał na odcinaniu próbek w równych odstępach czasowych. Wskaźnik szybkości płynięcia, wyrażony w g/10 min, obliczono ze wzoru (1):

$$\text{MFR}(T, m_{\text{nom}}) = 600 \text{ m} / t \quad (1)$$

gdzie:

T - temperatura badania, w °C

$m_{\text{nom}}$  - nominalne obciążenie, w kg

m - średnia masa wytłoczek, w g

t - odstęp czasu odcinania, w s

600 - współczynnik do przeliczania gramów na sekundę na gramy na 10 minut.

Trójwymiarowe rusztowania wytworzono metodą szybkiego prototypowania na urządzeniu BioScaffolder (SYSENG, Niemcy) w temperaturze 167°C i pod ciśnieniem 0,2 MPa. Bioscaffolder umożliwia przyrostowe formowanie trójwymiarowych rusztowań za pomocą uplastycznionego polimeru (wytłaczanie).

Obserwację mikroskopową wytworzonych rusztowań przeprowadzono na skaningowym mikroskopie elektronowym TM3000 (Hitachi, Japonia). Zdjęcia wykonano w trybie BSE przy napięciu 15keV oraz różnych powiększeniach.

## Wyniki i dyskusja

Dodatek 30% wagowych PLGA spowodował około 3-krotne obniżenie wskaźnika szybkości płynięcia w porównaniu do czystego PHBV. Spadek wskaźnika był wynikiem dodatku PLGA, który wykazuje znacznie mniejszą płynność niż PHBV (MFR (190°C, 2,16kg) = 5,65 g/10min), a w temperaturze wyznaczania MFR dla mieszanki PHBV/PLGA praktycznie nie płynie (badanie własne). Obserwacje mikroskopowe potwierdziły, iż zmniejszenie płynności PHBV pozwoli-

MFR was determined by means of a plastometer (Modular Line Melt Flow, Ceast, Italy). Conditions of measurements are shown in TABLE 1. The melt flow rate, expressed as g/10min, was calculated from formula 1:

$$\text{MFR}(T, m_{\text{nom}}) = 600 \text{ m} / t \quad (1)$$

where:

T - temperature of the test, in °C

$m_{\text{nom}}$  - nominal load, in kg

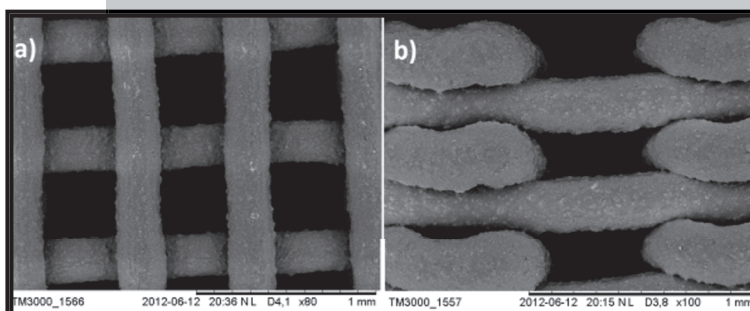
m - average mass of the extrudates, in g

t - time interval between cuts, in s

600 - conversion factor from grams per second to grams per 10 minutes.

Three-dimensional scaffolds were fabricated on a FDM-device BioScaffolder (SYSENG, Germany) at 167 °C and a pressure of 0.2 MPa. BioScaffolder enables formation of three-dimensional scaffolds by deposition of molten polymer (extrusion) layer by layer.

Microscopic observation of scaffolds was performed on scanning electron microscope TM3000 (Hitachi, Japan). Micrographs were taken in BSE mode at an acceleration voltage of 15keV and variety of magnifications.



**RYS.1. Mikrofotografie SEM wytworzonych rusztowań z PHBV/PLGA: a) widok z góry; b) widok z boku.**

**FIG.1 SEM micrographs of PHBV/PLGA scaffolds: a) top view; b) side view.**

## Results and discussions

Addition of 30 wt% of PLGA resulted in over a triple decrease of MFR if compared to neat PHBV. The decrease of the index was due to presence of PLGA, which exhibits MFR lower than PHBV (MFR (190°C, 2,16kg) = 5,65 g/10min) and hardly flows at 165 °C (temperature of measurement of MFR for PLGA/PHBV blend). This addition allowed to produce 3D scaffolds. Microscopic observation confirmed the potential of PHBV/PLGA blend for FDM applications. SEM micrographs of fabricated scaffolds of PHBV/PLGA are shown in FIGURE 1. It can be seen that the scaffolds made of blend had completely interconnected, open pores and uniformly distributed fibers. In addition, SEM observations of surface morphology confirmed presence of inclusions of PLGA (in the form of microspheres).



ło na wytworzenie trójwymiarowych. Na RYS.1 przedstawiono mikrofotografie SEM rusztowań wytworzonych z PHBV/PLGA, które posiadały otwarte i wzajemnie ze sobą połączone pory oraz równomierne rozłożone włókna. Dodatkowo obserwacje morfologii powierzchni pozwoliły stwierdzić obecność inkluzji PLGA (w postaci mikrosfer).

## Wnioski

Przedstawione w tej pracy wyniki sugerują, że mieszanka PHBV/PLGA jest obiecującym materiałem do wytwarzania trójwymiarowych i porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej. Dalsza praca skupi się na badaniach właściwości mechanicznych, profilu degradacji oraz biogodności opisanych rusztowań.

## Podziękowania

*Praca została zrealizowana w ramach projektu „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych” finansowanego z Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (Nr projektu POIG.01.01.02-00-022/09).*

## Conclusions

Results presented here suggest that the PHBV-PLGA blend is a promising material for fabrication of three-dimensional and porous scaffolds for tissue engineering. Further work will focus on the study of mechanical properties, degradation profile and biocompatibility of described scaffolds.

## Acknowledgments

*This work was supported by the European Regional Development Fund within the Innovative Economy Operational Programme in the frame of project BIO-IMPLANT (Grant No. POIG.01.01.02-00-022/09).*

## Piśmiennictwo

- [1] S. K. Misra, S. P. Valappil, I. Roy, A. R. Boccaccini, Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *BioMacromolecules* 2006, Vol. 7, No. 8: 2250-2258.
- [2] M. Zinn, B. Witholt, T. Egli, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 53: 5-21.

## References

- [3] K. Rezwana, Q.Z. Chena, J.J. Blakera, A. R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27:3413-3431.
- [4] T. Garbacz, J. W. Sikora; *Przetwórstwo tworzyw polimerowych, Ćwiczenia laboratoryjne, Część 1*; Politechnika Lubelska; 2012.

## MODYFIKACJA POWIERZCHNI TYTANU METODAMI PLAZMOCHEMICZNYMI

MARTA JANUŚ\*, JADWIGA KONEFAŁ-GÓRAL, ANNA MAŁEK,  
STANISŁAWA KLUSKA, STANISŁAWA JONAS

AGH AKADEMIA GÓRNICZO - HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30 - 059 KRAKÓW, POLSKA

\*MAILTO: MARTAJ@AGH.EDU.PL

### Streszczenie

*W pracy przedstawiono wyniki badań nad modyfikacją powierzchni tytanu Ti Grade 2 warstwami a-C:H i a-C:N:H oraz warstwami węglazotku krzemu  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  przy zastosowaniu metody chemicznego osadzania z fazy gazowej ze wspomaganie plazmowym MWCVD (2kW, 2.45GHz) oraz RFCVD (400W, 13.45MHz). W roli prekursorów gazowych zastosowano  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{SiH}_4$  oraz Ar. Określono zachowanie korozyjne w roztworze sztucznej śliny otrzymanych układów warstwa-podłoże metaliczne w porównaniu z niemodyfikowanymi metalami.*

**Słowa kluczowe:** warstwy  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ , PACVD, Ti Grade 2, biomateriały tytanowe  
[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 82-85]

### Wprowadzenie

Wśród obszernej grupy technik kształtowania właściwości materiałów drogą modyfikacji ich powierzchni czołowe miejsce zajmuje chemiczne osadzanie z fazy gazowej wspomaganie plazmą PACVD (Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition) pozwalające na wytworzenie jednolitej, dobrze przyczepnej do podłoża warstwy o określonej grubości i założonym wcześniej składzie chemicznym [1]. Wykorzystanie tej metody do modyfikacji powierzchni tytanu daje nadzieję na wytworzenie materiału o odpowiednich właściwościach umożliwiających długoterminowy kontakt z żywym organizmem i z powodzeniem wpisuje się w najnowsze kierunki rozwoju biomateriałów metalicznych. Głównym celem takiej zmiany powierzchni, przy zachowaniu zalet tytanu, między innymi dobrych właściwości biologicznych, jest eliminacja lub ograniczenia jego wad (niskiej odporności na ścieranie, niewystarczającej odporności na korozję) [2]. W pracy autorzy skupili się na analizie właściwości korozyjnych podłoża tytanu Ti Grade 2 zmodyfikowanego amorficznymi warstwami węglowymi a-C:H, węglowymi dotowanymi azotem a-C:N:H oraz warstwami zawierającymi węgiel, azot, krzemu i wodór. Węglazotek krzemu łączy korzystne właściwości węgla krzemu  $\text{SiC}$  i azotku krzemu  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , a tym samym wykazuje dużą odporność na utlenianie w wysokich temperaturach, wysoki moduł sprężystości oraz niski współczynnik tarcia [3,4]. Co więcej taki „naturalny” skład pierwiastkowy jest bezpieczny dla żywego organizmu. Należy przypuszczać, że połączenie zalet podłoża tytanowego i warstw  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  wytworzonych metodami MWCVD pozwoli otrzymać materiał o bardzo dobrych właściwościach korozyjnych i biologicznych.

### Technologia i metody badań

Warstw a-C:H, a-C:N:H i  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  na podłożu tytanu Ti Grade 2 drogą osadzania warstw metodą PACVD z zastosowa-

## SURFACE MODIFICATION OF TITANIUM WITH PLASMOCHEMICAL METHODS

MARTA JANUŚ\*, JADWIGA KONEFAŁ-GÓRAL, ANNA MAŁEK,  
STANISŁAWA KLUSKA, STANISŁAWA JONAS

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
30 A.MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

\*MAILTO: MARTAJ@AGH.EDU.PL

### Abstract

*The paper presents results of research on titanium Ti Grade 2 surface modification with a-C:H, a-C:N:H and silicon carbonitride  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layers synthesis by plasma assisted chemical vapour deposition method MWCVD (2kW, 2.45GHz) and RFCVD (400 W, 13.45MHz). As a gas precursors  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{SiH}_4$  and Ar were used. Corrosion behaviour of obtained systems in the solution of artificial saliva determined in comparison with the unmodified metal.*

**Keywords:**  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layers, PACVD, Ti Grade 2, titanium biomaterials  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 82-85]

### Introduction

Among the extensive group of techniques allowing on formation materials with appropriate properties by modifying their surface special place has a plasma-assisted chemical vapour deposition PACVD method by synthesis homogeneous layer with well adhesive to the substrate and with tailored thickness and chemical composition [1]. Using this method for titanium surface modification gives possibility for producing a material with adequate properties for long-term contact with a living organism and successfully entered into the latest developments of metallic biomaterials. The main purpose of the modification, while retaining the advantages of titanium, for example the good biological properties, is to eliminate or reduce the titanium disadvantages (low resistance for abrasion, insufficient corrosion resistance) [2]. In this work the authors concentrate on the analysis of the corrosion properties of titanium Ti Grade 2 substrates modified by amorphous diamond-like carbon a-C:H layers, nitrogenated diamond-like carbon a-C:N:H layers and layers containing carbon, nitrogen, silicon and hydrogen. Silicon carbonitride combines the properties of silicon carbide  $\text{SiC}$  and silicon nitride  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , and thus exhibit very good mechanical properties, such as high hardness and mechanical strength, as well as good thermal and chemical stability, especially high temperature oxidation resistance [3,4]. Moreover, “natural” composition of this layer is safe for the living organism. It is assumed that combination of the advantages of titanium substrate and  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layers obtained by MWCVD methods will get the material with very good corrosion and biological properties.

### Technology and methods

The a-C:H, a-C:N:H and  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layers were obtained using chemical vapour deposition techniques where plasma is generated by microwave (MWCVD, 2kW, 2.45GHz) and radio wave (RFCVD, 400W, 13.45 MHz). As gaseous precursors  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{SiH}_4$  and Ar were used. Before

waniem plazmy generowanej mikrofalami (MWCVD, 2kW, 2.45GHz) oraz radiofalami (RFCVD, 400W, 13.45MHz). W roli reaktywnych prekursorów gazowych zastosowano mieszaninę zawierającą: CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, SiH<sub>4</sub>, Ar. Przed każdym procesem osadzania powierzchnię metalu przemywano w acetonie oraz poddawano procesowi trawienia w plazmie argonowej celem usunięcia z powierzchni tlenków typu TiO<sub>x</sub>. Warunki procesów zestawiono w TABELI 1.

Skład chemiczny, mikrostrukturę oraz strukturę atomową otrzymanych materiałów badaną za pomocą technik SEM/EDS oraz FTIR przedyskutowano we wcześniejszych publikacjach autorów [5].

W pracy przedstawiono wyniki badań nad odpornością korozyjną w roztworze sztucznej śliny (0,84g/l NaCl, 1,2g/l KCl, 0,06g/l CaCl<sub>2</sub>, 0,34g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15g/l MgCl<sub>2</sub>) ocenioną na podstawie przyspieszonych technik polaryzacyjnych. Pomiar polaryzacyjny wykonano w układzie trójelektrodowym, w którym elektrodą badaną były kolejno otrzymane metodą PACVD próbki, elektrodą pomocniczą elektrodą platynową, elektrodą odniesienia elektrodą chloro-srebrną Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup>. Badania polaryzacyjne wykonano technikami woltamperometrycznymi (z szybkością 50 mV/s) oraz chronoamperometrycznymi ( $E=E_k+100\text{mV}$ ). Technika atomowej spektroskopii masowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie ICP MS oceniono zmiany składu chemicznego roztworów po ekspozycji próbek badając ilość pierwiastków z podłoża metalicznego w roztworze „pokorozyjnym”.

## Wyniki

Porównując wartości potencjałów korozyjnych czystego podłoża tytanowego oraz podłoża po modyfikacji warstwami odpowiednio węglowymi a-C:H, węglowymi dotowanymi azotem a-C:N:H oraz warstwami węglazotku krzemu SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H), podczas korozji w roztworze sztucznej śliny (RYS.1), należy zauważyć wzrost wartości potencjału korozyjnego czystego tytanu w roztworze zawierającym fosforany będący wynikiem prawdopodobnie stopniowej pasywacji związanej z równowagami pomiędzy tworzącymi się tlenkami, a fosforanami tytanu. Warstwę a-C:H cechują jeszcze niższe wartości potencjałów będące najprawdopodobniej wynikiem utrudnionej pasywacji tlenkowej. Być może jej mocniejsza aktywacja jest wynikiem tworzenia się fosforanów, którym towarzyszą równowagi ustalające się przy niższych wartościach potencjału korozyjnego. Oscylacje obserwowane na powierzchni pokrytej warstwą węglową dotowaną azotem a-C:N:H wskazują na jej niestabilny stan powierzchni, a wysoka wartość potencjału na

**TABELA 1. Parametry procesu RFCVD-MWCVD podczas osadzania warstw na podłożu Ti Grade 2.**

**TABLE 1. RFCVD-MWCVD process parameters applied during layers deposition on Ti Grade 2 substrate.**

Seria/Series	Warstwa/ Layer	P* [W]	p* [Tr]	T* [°C]	t* [h]	Przepływ gazu/Gas flow [cm³/min]						
						Ar	N <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	SiH <sub>4</sub>	
RFCVD	1	a-C:H	80	0,4	25	1	80	--	--	10	20	--
RFCVD	2	a-C:N:H	80	0,4	25	1	75	85	--	10	--	--
MWCVD	3	SiC <sub>x</sub> N <sub>y</sub> (H)	400	0,3	600	0,5	225	--	130	20	--	3

\*P- moc plazmy/plasma generator power, p- ciśnienie/vacuum pressure,  
t- czas osadzania/time deposition, T- temperatura osadzania/temperature deposition

\*P- moc plazmy/plasma generator power, p- ciśnienie/vacuum pressure, t- czas osadzania/time deposition, T- temperatura osadzania/temperature deposition

each deposition process, for the initial cleaning, the substrates were chemically cleaned, and then ion-etching in argon plasma to remove oxides such as

TiO<sub>x</sub> from surfaces. Process condition of MWCVD-RFCVD is given in TABLE 1.

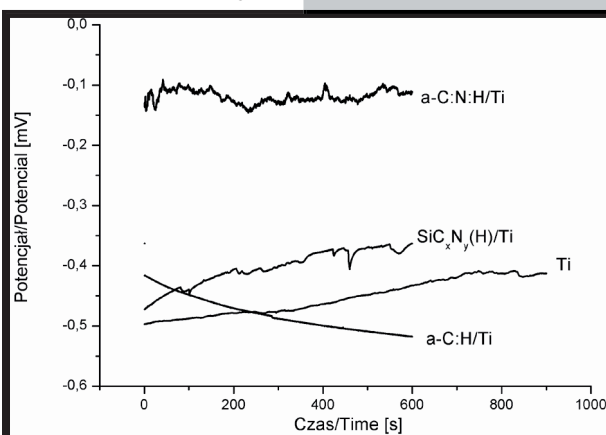
The chemical composition, microstructure and atomic structure of the materials were studied by SEM/EDS and FTIR techniques in the authors previous publications [5].

This paper presents results of research on samples corrosion resistance in artificial saliva solution (0.84g/l NaCl, 1.2g/l KCl, 0.06g/l CaCl<sub>2</sub>, 0.34g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15g/l MgCl<sub>2</sub>) determined on the basis of polarization techniques. Polarization measurements were performed in the system in which the test electrode were obtained by PACVD samples. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> and platinum electrode were also applied as references and auxiliary, respectively. Polarization studies were performed in voltamperometric (rate of polarization 50 mV/s) and chronoamperometric ( $E=E_{\text{cor}}+100\text{mV}$ ) techniques. After corrosion process the “post corrosion” saliva solutions were examined with application ICP MS methods to determine the number of titanium in this medium. The solutions analysis were done for unmodified surfaces and samples covered by a-C:H, a-C:N:H and SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layers.

## Results

Comparing the corrosion potential for unmodified titanium and metal after surface modification with diamond-like carbon a-C:H, nitrogenated diamond-like carbon a-C:N:H and silicon carbonitride layers SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H), after the corrosion process in an artificial saliva solution (FIG.1) should be noted that corrosion potential for unmodified titanium increase because of presence in this solution phosphate compounds. This fact is caused by the progressive passivation and chemical equilibria between forming titanium oxides and

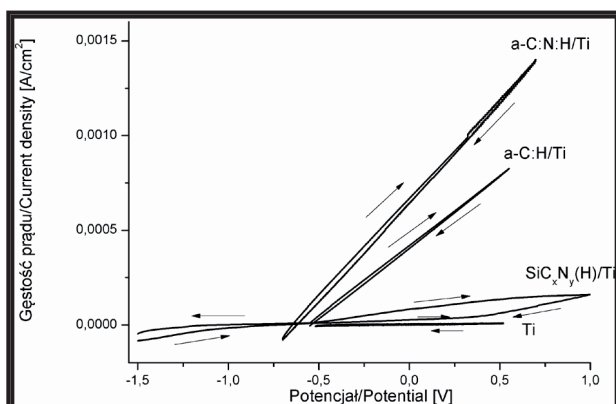
titanium phosphates. The a-C:H layers are characterized even by lower corrosion potentials which are probably the result of difficulties in oxide passivation. Perhaps it is due to stronger activation of the phosphates formation for which chemical equilibria occurs under lower corrosion potential. Oscillations observed on the surfaces covered with nitrogenated diamond-like carbon layer (a-C:N:H) show unstable character of this films. The high value of the corrosion potential indicates the stronger tendency to oxidation. In the case of the silicon carbonitride layers phosphates formed on the surface stimulate the redox processes into layer ingredients oxidation. Polarization curves, presented



**RYS. 1. Potencjał korozyjny w roztworze sztucznej śliny dla badanych warstw i dla niemodyfikowanego tytanu.**

**FIG. 1. Corrosion potential in artificial saliva solution for unmodified titanium and for studied layers.**





**RYS. 2.** Krzywe voltamperometryczne dla badanych warstw oraz dla niemodyfikowanego tytanu (szybkość polaryzacji 50mV/s).

**FIG. 2.** Voltamperometric curves for unmodified titanium and for studied layers (rate of polarization 50 mV/s).

większą tendencję do utleniania. W przypadku warstwy węglazotku krzemu powstające fosforany stymulują procesy redoksowe w kierunku utleniania składników warstwy. Krzywe polaryzacji przedstawione na RYS.2 wskazują wyraźnie, że osadzony węglazotek krzemu nie narusza struktury tytanu i nie pogarsza jego odporności korozyjnej. Zdecydowanie wyższe gęstości prądu anodowego obserwowane na powierzchniach z warstwami a-C:H i a-C:N:H wskazują, że proces anodowego utleniania składników powierzchni warstw przebiega znacznie szybciej aniżeli na czystym tytanie lub na warstwie  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ . Co więcej warstwy węglowe wykazują korozję lokalną. Wyniki badań krzywych polaryzacyjnych wykonanych techniką LSV (ang. linear sweep voltammetry) znajdują potwierdzenie w przebiegach krzywych chronoamperometrycznych (RYS. 3). Jedynie warstwa  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  jest skuteczną barierą hamującą roztrawianie tytanu. Pozostałe warstwy stymulują procesy utleniania. W przypadku warstw a-C:H i a-C:N:H naturalna warstwa tlenkowa występująca na powierzchni niemodyfikowanego podłoża (titanu), trwała termodynamicznie, skuteczniej niż warstwy węglowe zabezpiecza metal w czasie polaryzacji.

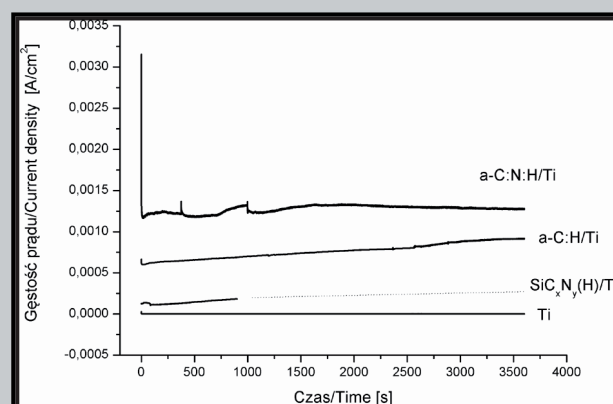
Powyższe badania uzupełniono poprzez pomiary składu chemicznego najbardziej agresywnego dla tytanu roztworu sztucznej śliny, które przedstawiono w Tabeli 2. Jak widać otrzymane warstwy ograniczają przechodzenie tytanu do roztworu, przy czym najskuteczniej warstwa węglazotku krzemu, która pięciokrotnie obniża ilość Ti w roztworze pokorozyjnym.

## Wnioski

Zamieszczone wyniki badań elektrochemicznych wskazują, że jedynie warstwa węglazotku krzemu nie pogarsza właściwości elektrochemicznych powierzchni tytanowych, a biorąc pod uwagę fakt ich synergizmu z właściwościami tribologicznymi stanowi perspektywiczną metodę modyfikacji powierzchni tego metalu [5].

## Podziękowania

Praca wykonana w ramach działalności statutowej AGH nr 11.11.160.603.



**RYS. 3.** Krzywe chronoamperometryczne dla badanych warstw i dla niemodyfikowanego podłoża tytanowego ( $E=E_{\text{kor}}+100$  mV).

**FIG. 3.** Chronoamperometric curves for or unmodified titanium and for studied layers ( $E=E_{\text{cor}}+100$  mV).

**TABELA 2.** Analiza ICP MS roztworów po korozji w sztucznej ślinie.

**TABLE 2.** ICP MS analysis of artificial saliva after corrosion process.

Próbka/Sample	Ti	a-C:H/Ti	a-C:N:H/Ti	$\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})/\text{Ti}$
Ti[mg/kg]	0,0012	<0,0010	<0,0010	<0,0002

in FIG.2, clearly shown that the silicon carbonitride layers deposited on titanium surfaces do not degraded the titanium structure and does not impair on titanium corrosion resistance. Much higher anodic current density observed on the surfaces

with a-C:H and a-C:N:H layers indicate that the process of anodic oxidation of this surface performed much faster than on unmodified titanium or on the  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  - titanium systems. What is more carbon layers exhibit local corrosion. The results from LSV polarization curves are confirmed by the chronoamperometric measurements (FIG.3). Only  $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$  layer is an effective barrier preventing the titanium dissolution. Other layers (diamond-like carbon a-C:H and nitrogenated diamond-like carbon a-C:N:H) stimulate the oxidation process on modified surfaces. In the case of a-C:H and a-C:N:H layers, the natural oxide on unmodified substrate (titanium), thermodynamically stable, more effectively protects this metal at the time of polarization than tested carbon layer.

This study was supplemented by measurements of chemical composition of the post-corrosion artificial saliva - the most aggressive biological solution for titanium materials. The results are given in TABLE 2. This analysis shown that all studied layers limit titanium transition to the artificial saliva solution, but the best results achieved for layers containing silicon. For this layer Ti concentration in the corrosive solution is five times lower than for unmodified titanium.

## Conclusions

Electrochemical test results show that only silicon carbonitride layer does not deteriorate the electrochemical properties of titanium surface, and taking into account the synergism with the tribological properties, this way of obtaining such systems is prospective method for effective metallic surface modification [5].

## Acknowledgments

The research work supported by an internal fund of the AGH in the frame of the Project 11.11.160.603.

## Piśmiennictwo

- [1] Glocker D.A., Ismat Shah S.: Handbook of thin film process technology. Bristol Philadelphia: IoP, 2002.
- [2] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Surface engineering in production Titanium biomaterials. Printing house of Warsaw University of Technology, Warszawa, 2004.
- [3] Hoche H., Allebrandt D., Bruns M., Riedel R., Fasel C.: Relationship of chemical and structural properties with the tribological behavior of sputtered SiCN films. Surface & Coatings Technology 202 (2008) 5567-5571.

## References

- [4] Li D., Guruvenket S., Azzi M., Szpunar J.A., Klemberg-Sapieha J.E., Martinu L.: Corrosion and tribo-corrosion behavior of a-SiC<sub>x</sub>H, a-SiN<sub>x</sub>H and a-SiC<sub>x</sub>Ny:H coatings on SS301 substrate. Surface & Coatings Technology 204 (2010) 1616-1622.
- [5] Konefał-Góral J., Małek A., Kluska S., Jonas S.: Modyfikacja powierzchni podłoży tytanowych warstwami węglazotku krzemu. Inżynieria Materiałowa 3 (2012) 185-188.

## MINERALIZACJA ENZYMATYCZNA KOMPOZYTÓW BIOSZKŁO/GUMA GELLAN

MAGDALENA PILARZ<sup>1</sup>, WOJCIECH PIWOWARCZYK<sup>1</sup>,  
GRZEGORZ KRAWCZYK<sup>1</sup>, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA<sup>2</sup>,  
TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>3</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

<sup>2</sup>AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA SZKŁA I POWŁOK AMORFICZNYCH,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

<sup>3</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP,  
GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GENT, BELGIUM

\*MAILTO: EPAMULA@AGH.EDU.PL

### Streszczenie

*W przypadku wykorzystania hydrożeli w inżynierii tkanki kostnej wskazane jest także ich zmodyfikowanie aby zawierały w swoim składzie składniki mineralne i/lub mogły ulegać samoistnej mineralizacji. W niniejszej pracy podjęto próbę wytworzenia kompozytów hydrożelowych z gumy gellan i różnej zawartości (0,75%, 1,5%, 3%) szkła bioaktywnego (BG) uzyskanego uprzednio metodą zol-żel. Kompozyty dodatkowo wzbogacono w enzym sprzyjający mineralizacji (fosfataza alkaliczna – ALP) oraz poddawano je inkubacji w roztworze glicerofosforanu wapnia (CaGP) przez czas 1, 3 i 7 dni. Oceniono właściwości mechaniczne kompozytów w próbie ściskania oraz dokonano pomiarów ich masy po wysuszeniu, które świadczyły o obecności BG oraz tworzeniu się fazy mineralnej. Morfologię próbek po wysuszeniu analizowano za pomocą mikroskopu stereoskopowego zaś ich mikrostrukturę za pomocą mikroskopu skaningowego elektronowego (SEM). Przeprowadzono też badania za pomocą mikroanalizy rentgenowskiej (EDS). Ba-*

## ENZYMATIC MINERALIZATION OF BIOGLASS/GELLAN GUM COMPOSITES

MAGDALENA PILARZ<sup>1</sup>, WOJCIECH PIWOWARCZYK<sup>1</sup>,  
GRZEGORZ KRAWCZYK<sup>1</sup>, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA<sup>2</sup>,  
TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>3</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF GLASS TECHNOLOGY AND AMORPHOUS COATINGS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>3</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP,  
GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GENT, BELGIUM

\*MAILTO: EPAMULA@AGH.EDU.PL

### Abstract

*When using hydrogels in bone tissue engineering it is desirable to modify them to include in their structure mineral particles and/or induce their spontaneous mineralization. In this study attempts to prepare gellan gum hydrogel/bioactive glass composites with various contents (0.75%, 1.5%, 3%) of sol-gel derived bioactive glass (BG) were undertaken. Composites were additionally enriched with an enzyme which promotes mineralization (alkaline phosphatase – ALP) and incubated in calcium glycerophosphate solution (CaGP) for 2, 4 and 7 days. Mechanical properties were evaluated on the basis of the results of compression tests and mass measurements of dried samples indicated the presence of BG and formation of mineral phases. Morphology and microstructure of dried samples were analyzed by stereomicroscopy and scanning electron microscopy (SEM), respectively. Studies using X-ray microanalysis (EDS) were also performed. It was found that in composites without ALP mineralization did not occur or only to a very small*

dania wykazały, że w kompozytach bez dodatku ALP mineralizacja nie zachodziła lub zachodziła w bardzo niewielkim stopniu. Obserwacje SEM i analiza EDS wykazały tworzenie się fosforanów wapnia w próbkach kompozytowych zawierających ALP po inkubacji w CaGP. Najkorzystniejsze właściwości mechaniczne wykazywały kompozyty wzbogacone w ALP i zawierające najmniej BG (0.75%) poddane 7-dniowej inkubacji w CaGP.

**Słowa kluczowe:** hydrożele, mineralizacja, ALP, inżynieria tkanki kostnej

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 85-88]

## Wstęp

Guma gellan jest polisacharydem produkowanym przez bakterie *Sphingomonas paucimobilis* i znalazła już zastosowanie jako rusztowanie do regeneracji tkanki chrzęstnej [1]. Aby można ją było zastosować do odbudowy tkanki kostnej, bardzo pożądana jest jej mineralizacja [2]. Nasze wcześniejsze badania wykazują, że dodatek enzymu – fosfatazy alkalicznej (ALP) i późniejsza inkubacja w roztworze glicerofosforanu wapnia (CaGP) wywołują tworzenie wydzieli mineralnych (fosforanów wapnia) na powierzchni jak i w objętości próbek hydrożelowych [3]. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie czy dodatek bioaktywnego szkła otrzymanego metodą zol-żel wpływałby korzystnie na mineralizację enzymatyczną gumy gellan. Otrzymane kompozyty badano pod kątem stopnia mineralizacji, składu chemicznego wytworzonych minerałów oraz właściwości mechanicznych w próbie ściskania.

## Materiały i metody

Próbki zostały przygotowane przez ogrzewanie roztworu GG (0.7%, Gelzam<sup>TM</sup> CM, Sigma) przez 30 min w 90°C, a następnie po ochłodzeniu do 50°C dodano ALP (0.5 mg/ml, Sigma), CaCl<sub>2</sub> (0.03%) oraz bioszkło (0.75% 0.5% lub 3.0% masa/obj.) i mieszaninę odlano na szklaną szalkę Petriego. Do przygotowania próbek użyto bioaktywnego szkła otrzymanego metodą zol-żel o składzie molowym: 80%SiO<sub>2</sub>–16%CaO–4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i wielkości ziaren poniżej 5 µm. Następnie za pomocą stempla uzyskano cylindryczne próbki o średnicy 8 mm i grubości 5 mm. Mineralizację prowadzono poprzez inkubację próbek w roztworze 0.1 M CaGP (Aldrich) przez 2, 4 oraz 7 dni; roztwór zmieniano codziennie. Po zakończeniu mineralizacji próbki zostały wypłukane w wodzie Milli-Q (3x) a następnie w niej inkubowane przez 1 dzień w celu wypłukania pozostałości CaGP.

Pozostałość suchej masy była wyliczona jako (masa próbek po inkubacji i po suszeniu/masa próbek po inkubacji przed suszeniem)•100%. Właściwości mechaniczne próbek były badane za pomocą testu ściskania na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 (prędkość obciążania 2 mm/min, odkształcenie 50%). W celu obserwacji morfologii kompozytów wykonano zdjęcia przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (StereoDiscovery, Carl Zeiss, Niemcy) oraz skaningowego mikroskopu elektronowego (NOVA NANOSEM 200, FEI, USA) wyposażonego w przystawkę do mikroanalizy rentgenowskiej EDS (Link, USA).

## Wyniki i dyskusja

Tworzenie się fazy mineralnej w materiałach wykazano pośrednio poprzez badania suchej masy oraz modułu Younga kompozytów GG/BG. Natomiast bezpośrednio efekt tego

degree. SEM observation and EDS analysis showed formation of calcium phosphate in samples containing ALP. The best mechanical properties were exhibited by composites enriched with ALP and with the lowest amount of BG (0.75%), incubated 7 days in CaGP.

**Key words:** hydrogels, mineralization, ALP, bone tissue engineering.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 85-88]

## Introduction

Gellan gum is a polysaccharide produced by the bacteria *Sphingomonas paucimobilis* and has already been used as a scaffold for cartilage regeneration [1], but for bone tissue engineering applications its mineralization would be very advantageous [2]. Our previous studies have shown that the addition of the enzyme – alkaline phosphatase (ALP) and subsequent incubation in a solution of calcium glycerophosphate (CaGP) induce formation of mineral (calcium phosphate) on the surface and the bulk of hydrogel samples [3]. The aim of this study was to determine whether the addition of bioactive glass obtained previously by a sol-gel method affects the enzymatic mineralization of gellan gum positively. Composites were evaluated with respect to amount and nature of mineral formed, the chemical composition of minerals and the mechanical properties in compression tests.

## Materials and methods

Samples were prepared by dissolving GG (0.7%, Gelzam<sup>TM</sup> CM, Sigma) in Milli-Q water for 30 min at 90°C. After cooling it to 50°C ALP (0.5 mg / ml, Sigma), CaCl<sub>2</sub> (0.03%) and bioglass (BG) were added and the mixture was cast onto a glass Petri dish. For sample preparation BG obtained by sol-gel with composition: SiO<sub>2</sub> 80%-16%CaO-4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and grain size below 5 µm was used. BG content was 0.75% 0.5% 3.0% (w/vol.). GG/BG hydrogel cylinders of diameter 8 mm and thickness 5 mm were prepared by cutting them out with a hole punch. Mineralization was performed by incubation of the samples in 0.1 M CaGP (Aldrich) for 2, 4 and 7 days; the solution was changed every day. After conclusion of mineralization, gels were rinsed three times in Milli-Q water and subsequently incubated in Milli-Q for 1 day with the aim of removing residual CaGP.

The dry mass percentage was calculated as: (weight after incubation and subsequent drying/weight after incubation before drying)•100. Mechanical properties of the samples were studied in compression tests on the universal testing machine Zwick 1435 (loading speed of 2 mm/min, strain 50%). Morphology of the composites was observed under a stereomicroscope (StereoDiscovery, Carl Zeiss) while microstructure was observed under a scanning electron microscope (NOVA NANOSEM 200, FEI, USA) equipped with an EDS microanalyzer (Link, USA).

## Results and discussion

Formation of mineral phase was demonstrated directly by dry mass and Young's modulus measurements of GG/BG composites. The effect of this process was confirmed indirectly by microscopic observations and EDS microanalysis.

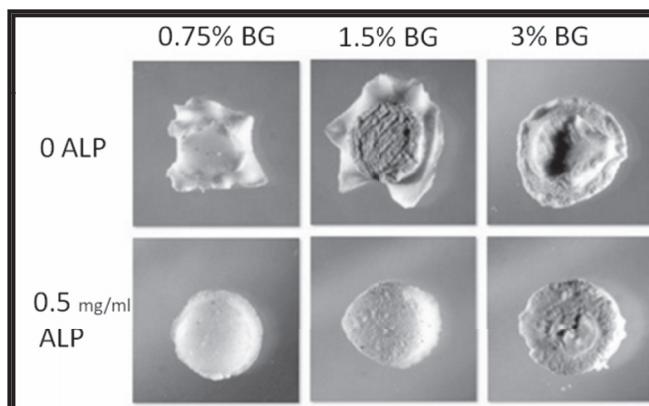
Analysis of dry mass percentage results for samples without ALP shows its higher values in the case of higher BG content, and that it does not change with incubation time in CaGP (FIG.1A; samples 0 ALP). In the case of the sample without BG, but containing only ALP, an increase of



procesu stwierdzono za pomocą badań mikroskopowych i mikroanalizy EDS.

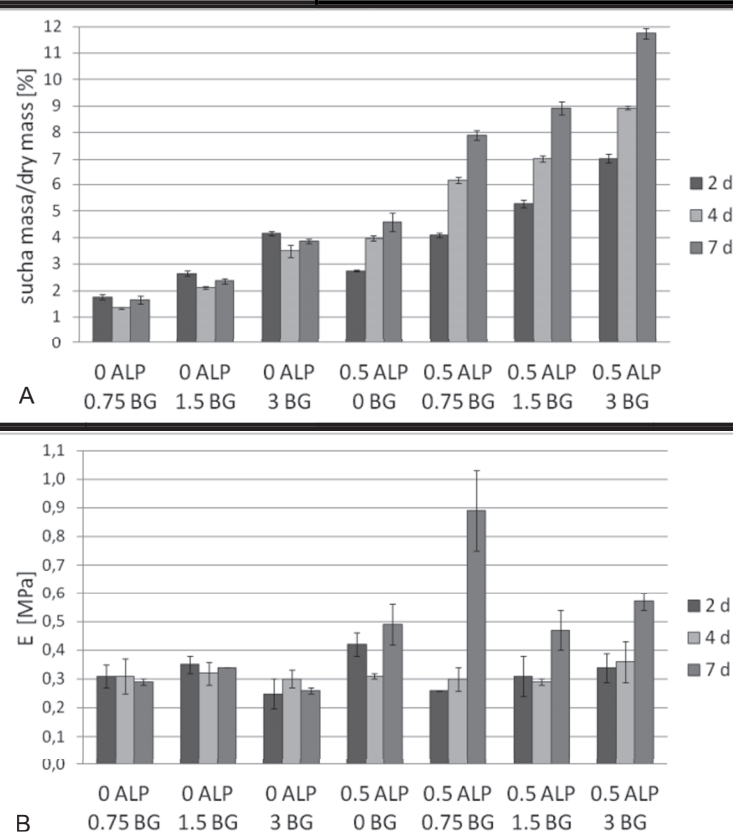
Analiza wyników suchej pozostałości w przypadku próbek kompozytowych nie zawierających ALP wykazuje jej większe wartości w przypadku większego udziału BG oraz to, że nie zmienia się ona w funkcji czasu inkubacji w CaGP (RYS.1A; próbki 0 ALP). W przypadku próbki nie zawierającej BG ale zawierającej tylko ALP występuje wzrost suchej pozostałości w funkcji czasu inkubacji, co jest spowodowane tworzeniem się fazy mineralnej (RYS.1A, próbka 0.5 ALP 0 BG). Natomiast dla trzech pozostałych zestawów próbek, tj. zawierających 0,5 ALP i różną zawartość BG, występuje istotny wzrost suchej pozostałości zarówno w funkcji czasu inkubacji jak i stężenia BG, co świadczy o tworzeniu się fazy mineralnej indukowanej przez obecność ALP.

Badania wytrzymałościowe wykazały, że obecność samego BG w żadnym z analizowanych stężeń jak i też czas inkubacji nie wpływają na moduł Younga próbek (RYS.1 B; próbki 0 ALP). Największy wzrost modułu Younga obserwuje się dla próbek zawierających ALP i 0.75% BG i inkubowanych przez 7 dni w CaGP. Może to być spowodowane lepszym i bardziej homogenicznym rozproszaniem cząstek BG w matrycy hydrożelowej, przez co również enzym jest rozproszony bardziej homogenicznie na granicach międzyfazowych. W konsekwencji grani-



**RYS. 2.** Morfologia próbek gumy gellan/bioszko o różnej zawartości bioszko (0,75%, 1,5%, 3%) bez ALP (0 ALP) i z zawartością 0,5 mg/ml ALP po inkubacji w CaGP przez 7 dni.

**FIG. 2.** Morphology of gellan gum/bioglass samples with various content of bioglass (0.75%, 1.5%, 3%) without ALP (0 ALP) and with 0.5 mg/ml ALP after incubation in CaGP for 7 days. Images from stereomicroscope. Size of images 5 mm x 5 mm.



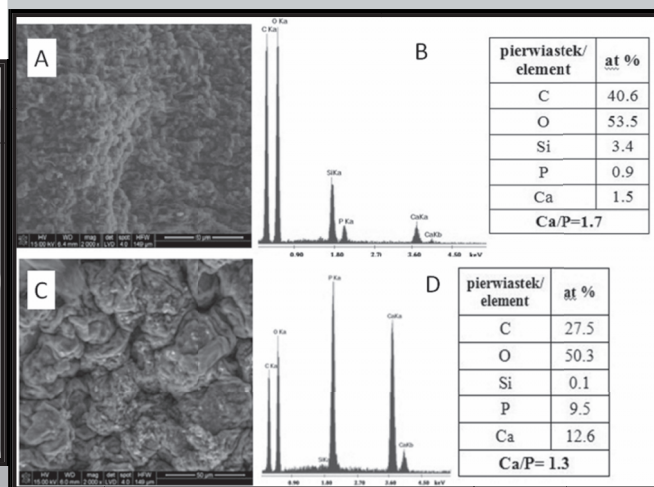
**RYS. 1.** Zmiany masy (A) i modułu Younga (B) próbek z gumy gellan o różnej zawartości bioszko (0,75%, 1,5%, 3%) bez ALP (0 ALP) i z zawartością 0,5 mg/ml ALP (0.5 ALP) po inkubacji w CaGP przez 2, 4 i 7 dni.

**FIG. 1.** Mass changes (A) and Young's modulus (B) of gellan gum/bioglass samples with various contents of bioglass (0.75%, 1.5%, 3%) without ALP (0 ALP) and with ALP (0.5 ALP) after incubation in CaGP for 2, 4 and 7 days.

dry residue with time is noted, which is caused by formation of mineral phase (FIG.1A; sample 0.5 ALP 0 BG). For the three additional sets of samples, i.e. containing 0.5 ALP and different concentrations of BG, a significant increase of dry residue as a function of time and BG concentration occurred, which is proof of mineral formation induced by ALP.

Mechanical tests demonstrated that the presence of BG itself at all analyzed concentrations, and incubation times does not influence Young's modulus of the samples (FIG.1B; samples 0 ALP). The highest increase of modulus is observed for the samples containing 0.5 ALP and 0.75% BG and incubated for 7 days in CaGP. It is probably caused by better and more homogeneous distribution of BG particles

in the hydrogel matrix, and as a result, the enzyme is more homogeneously distributed at the interface hydrogel



**RYS. 3.** Obrazy SEM (A, C) i analiza EDS (B, D) próbek z gumy gellan o zawartości 0,75% bioszko bez ALP (A, B) oraz z zawartością 0,5 mg/ml ALP (C, D) po inkubacji w CaGP przez 7 dni.

**FIG. 3.** SEM pictures (A, C) and EDS analysis (B, D) of gellan gum/bioglass samples with bioglass content of 0.75% without ALP (A, B) and with 0.5 mg/ml ALP (C, D) after incubation in CaGP for 7 days.

ce międzyfazowe stanowią drogi szybszej dyfuzji dla jonów wapniowych i fosforanowych i wpływają korzystnie na indukcję mineralizacji. Hipoteza ta znajduje swoje potwierdzenie również w obserwacjach w mikroskopie stereoskopowym: tylko próbki zawierające ALP zachowują kształt wałców po wysuszeniu, natomiast te zawierające tylko BG są nieforemne (RYS.2). Obserwacje SEM i analiza EDX wskazują, że kompozyty GG/BG bez ALP są tylko mieszaniną GG i bioszklą. Świadczy o tym niska zawartość Ca (1,5%) i P (0,9%) i dość wysoka wartość Ca/P (RYS.3A). W przypadku próbek kompozytowych wzbogaconych w ALP obserwuje się kilkakrotny wzrost zawartości Ca (12,6%) i P (9,5%) a wartość Ca/P jest znacznie niższa. Świadczy to również o mineralizacji enzymatycznej GG, która jest wspomagana przez obecność BG.

W podsumowaniu można stwierdzić, że obecność niewielkiej ilości szkła bioaktywnego w matrycy hydrożelowej wzbogaconej w ALP wpływa korzystnie na parametry mechaniczne otrzymanego kompozytu oraz na zachowanie kształtu próbek po procesie mineralizacji. Uzyskane wyniki są obiecujące i wskazują, że opracowane materiały po przeprowadzeniu badań biologicznych będą mogły w przyszłości być rozważane jako rusztowania do leczenia ubytków tkanki kostnej.

## Podziękowania

*Badania zostały sfinansowane z prac statutowych Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie (Nr 11.11.160.256)*

/ BG grain boundaries. Consequently, the interfaces act as paths of faster diffusion of calcium and phosphate ions and positively influence the mineralization induction. This hypothesis is also confirmed by the stereoscopic microscope observations: only samples containing ALP preserve their cylindrical shape after drying, whereas those containing only BG are irregular (FIG.2). SEM observations and EDS analysis show that the composites GG/BG without ALP are simply mixtures of GG and BG. This is evidenced by the low content of Ca (1.5%) and P (0.9%) and relatively high value of the Ca/P ratio (FIG.3A). In the case of composite samples enriched with ALP, a several fold increase of Ca (12.6%) and P (9.5%) is observed and the value of Ca/P is much lower. It is also proof of the process of enzymatic mineralization GG, which is supported by the presence of BG particles.

In summary it can be concluded that the presence of small amount of bioactive glass in the hydrogel matrix enriched with ALP positively affected mechanical properties and shape stability of the composite samples after mineralization process. The mineralized GG/BG composite materials developed may be in the future considered as scaffolds to treat bone tissue defects, after biological testing.

## Acknowledgements

*This study was supported from AGH University of Science and Technology statutory works (No 11.11.160.256)*

## Piśmiennictwo

- [1] Oliveira, J.T., Martins, L., Picciochi, R., Malafaya, P.B., Sousa, R.A., Neves, N.M., Mano, J.F., Reis, R.L. Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications, J Biomed Mater Res A. 2010, 93(3), 852-63.
- [2] Gkioni K, Leeuwenburgh SCG, Douglas TEL, Mikos AG, Jansen J. Mineralization of hydrogels for bone regeneration, Tissue Eng Part B Rev. 2010, 16(6), 577-585.

## References

- [3] Douglas TE, Gassling V, Declercq HA, Purcz N, Pamula E, Haugen HJ, Chasan S, de Mulder EL, Jansen JA, Leeuwenburgh SC. Enzymatically induced mineralization of platelet-rich fibrin. J. Biomed. Mater. Res. A. 2012, 100(5), 1335-46.

# BIOLOGICZNA OCENA WARSTW WĘGLOWYCH DOMIESZKOWANYCH SREBREM

W.JAKUBOWSKI<sup>1\*</sup>, P.KOMOROWSKI<sup>1</sup>, D.BOCIAGA<sup>2</sup>, D.BATORY<sup>2</sup>,  
P.NIEDZIELSKI<sup>2</sup>, B.WALKOWIAK<sup>1</sup>

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ

<sup>1</sup> ZAKŁAD BIOFIZYKI

<sup>2</sup> ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

*Postęp w naukach biologicznych i medycznych jest obecnie coraz silniej uzależniony od gromadzenia i poddawania analizie informacji o wzajemnych relacjach między komórkami żywych organizmów a powierzchniami materiałów abiotycznych. Szczególnie istotne jest to w dziedzinach związanych z wykorzystaniem biomateriałów, ale taka zależność jest też silnie widoczna w obszarze obejmującym przemysł przetwórczo-spożywczy. Oddziaływania materiał - komórka żywa, w znacznej mierze wykraczają poza dotychczas postrzegany zakres standardowego wykorzystania biomateriałów, a odkrycia na polu interakcji powierzchni materiałów z komórkami mają coraz większe znaczenie w prawidłowym użytkowaniu nowoczesnych systemów dystrybucji wody pitnej, a także przemysłowych systemów chłodzenia i obiegu cieczy.*

*Wspomniany postęp stawia kolejne wyzwania przed inżynierią materiałową, która odpowiada za opracowywanie nowych technologii i materiałów mających spełniać coraz bardziej rygorystyczne oczekiwania użytkowników. Lepsze zrozumienie zależności w jakich pozostaje układ środowisko - organizmy żywe - materiał inżynierski prowadzą do wyeliminowania materiałów stwarzających potencjalnie zagrożenie, z jednoczesnym wprowadzeniem nowych materiałów, lepiej spełniających swoje funkcje.*

*W procesie opracowania materiałów o wysokiej biogodności uwagę naukowców w dużej mierze skupia grupa problemów związanych z zasiedlaniem powierzchni abiotycznych przez mikroorganizmy. Ograniczenie lub wyeliminowanie procesu kolonizacji powierzchni biomateriałów, zwykle prowadzącego do rozwinięcia się trudno zwalczanego biofilmu, stanowi istotne wyzwanie dla nowo opracowywanych biomateriałów. W literaturze fachowej dostrzegane są niekorzystne efekty, obserwowane przede wszystkim w praktyce klinicznej, do jakich doprowadza rozwinięcie się biofilmu na powierzchniach implantów. Opisywany jest także efekt wzrostu oporności takich kolonii bakteryjnych na działania układu immunologicznego oraz farmakoterapię.*

*Jedną z możliwych modyfikacji powierzchni, pozwalających na ograniczenie zasiedlania ich przez mikroorganizmy, jest wprowadzenie elementów o działaniu bakterio- i grzybobójczym. W Instytucie Inżynierii Materiałowej opracowany został materiał, wytwarzany metodą hybrydową RF PACVD/MS, łączący bioinertny charakter warstw węglowych z bakteriobójczymi właściwościami jonów srebra. Powłoka tego typu pozwala na znaczące ograniczenie adhezji bakterii prowadzącej do rozwoju biofilmu na powierzchni materiału, przy jednoczesnej znoklejeniu cytotoksyczności dla komórek organizmów wyższych.*

*Wyniki eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem modelowych hodowli bakterii E.coli (DH5α) oraz komórek ludzkich osteoblastów (Saos 2) i komórek śródbłonna (EA.hy 926) w pełni potwierdziły zakładane właściwości nowego materiału.*

**[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 89]**

# BIOLOGICAL EVALUATION OF CARBON LAYERS DOPED WITH SILVER

W.JAKUBOWSKI<sup>1\*</sup>, P.KOMOROWSKI<sup>1</sup>, D.BOCIAGA<sup>2</sup>, D.BATORY<sup>2</sup>,  
P.NIEDZIELSKI<sup>2</sup>, B.WALKOWIAK<sup>1</sup>

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

*Progress in biological sciences and medicine is today increasingly dependent on collecting and examining information on the relationship between the cells of living organisms and abiotic surfaces of different materials. This is especially important in areas related to the use of biomaterials, and this dependence is particularly evident in certain areas such as the food industry. Interactions between material - living cells, has until recently been largely considered outside the scope of the standard use of biomaterials. The discovery of cell interactions with material surfaces are of growing importance in the proper use of modern drinking water distribution systems, industrial cooling systems and fluid circulation.*

*This progress poses new challenges for materials engineering, which is responsible for the development of new technologies and materials that must meet increasingly stringent standards. With a better understanding of relationships present in such a system: environment - living cells - material engineering, it will be possible to eliminate any materials that poses a potential threat, and introduce new materials, that perform their functions more efficiently.*

*In the process of developing materials with high a degree of biocompatibility, much of the research has focused on the problem of abiotic surface colonization by different microorganisms. One of the most significant challenges in developing new biomaterials is the reduction or elimination of biomaterial surface colonization, which usually leads to the development of a biofilm. In the literature the adverse effects of such interactions have been observed, primarily in clinical practice and the development of biofilms on the surface of implants. Increased resistance of these bacterial colonies to the human immune system and drug therapy has also been described.*

*One possible material surface modification, which could reduce microorganism colonization, is the introduction of elements that exhibit bactericidal and fungicidal activity. The Institute of Materials Engineering has developed a material produced using a hybrid method RF PACVD/MS, which combines the bioinert nature of carbon layers and the bactericidal properties of silver ions. Such a coating can significantly reduce the degree bacterial adhesion, which results in the development of a biofilm on the surface materials, whilst having a negligible cytotoxic effect on the cells of higher organisms.*

*Results of experiments conducted using the model bacterium E. coli culture (DH5α) together with human osteoblastic (Saos 2) and endothelial cells (EA.hy 926) have fully confirmed the assumed properties of this new material.*

**[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 89]**



## OCENA CYTOZGODNOŚCI IN VITRO CERAMICZNYCH SUBSTYTUTÓW TKANKI KOSTNEJ OPARTYCH NA $\alpha$ -TCP

MAGDALENA NOGA<sup>1</sup>, RADOSŁAW OLKOWSKI<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL<sup>1</sup>, DOMINIKA SIEK<sup>2</sup>,  
JOANNA CZECHOWSKA<sup>2</sup>, ANETA ZIMA<sup>2</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII,  
CENTRUM BIOSTRUKTURY, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA

<sup>2</sup>WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

### Streszczenie

Fosforany wapnia (CaPs) ze względu na ich mineralogiczne podobieństwo do nieorganicznego składnika kości oraz zdolność do tworzenia bezpośredniego wiązania z tkanką kostną stanowią obiecującą grupę biomateriałów kościozastępczych. W celu sprawdzenia cytozgodności potencjalnych materiałów implantacyjnych stosuje się wiele różnych testów analizujących zmiany w integralności błony komórkowej, aktywności enzymów związanych z metabolizmem komórki czy też zdolności do proliferacji. Pozytywny wynik cytozgodności *in vitro* pozwala na dopuszczenie materiału do dalszych badań *in vivo*. Celem niniejszej pracy była ocena cytozgodności *in vitro* cementów kostnych opartych na fosforanie wapnia w odmianie krystalograficznej  $\alpha$  ( $\alpha$ -TCP).

Wykonano badania cytozgodności następujących materiałów ceramicznych typu cementowego oznaczonych jako: T-AP (na bazie  $\alpha$ -TCP), TK-AP i TK-CM (na bazie  $\alpha$ -TCP i kalcytu) oraz AHT-M i CHMT-M (opartych na  $\alpha$ -TCP i hydroksyapatycie dotowanym odpowiednio srebrem lub magnezem).

Do badania cytotozgodności materiałów wykorzystano linię komórek MG-63. Komórki te posiadają fenotyp osteoblastów we wczesnej fazie różnicowania i stanowią model komórek kostnych w badaniach *in vitro*. Wszystkie rodzaje próbek zasiedlono komórkami MG-63, a po 48 godz. hodowli oznaczono aktywność metaboliczną komórek za pomocą testu XTT. Część próbek ceramicznych poddano przed zasiedleniem godzinnej preinkubacji w pożywce hodowlanej. Ponadto wykonano pomiar stężenia jonów wapnia w pożywce pobranej z hodowli komórek na próbkach ceramicznych oraz w pożywce, w której przez 24 godz. ekstrahowane były materiały.

Komórki MG-63 hodowano w obecności wyciągów z materiałów ceramicznych o stężeniu 100% (pełen wyciąg), 50%, 25%, 12,5% i 0% (czysta pożywka hodowlana). Aktywność metaboliczną komórek zbadano po 24 i 48 godzinach hodowli za pomocą testu XTT. Komórki poddano także obserwacji mikroskopowej.

Przeprowadzono ciągłą obserwację mikroskopową komórek w kontakcie z każdym z materiałów. Komórki wysiano do 48-studzienkowej płytki hodowlanej, a następnie w studzienkach umieszczono próbki ceramiczne i przez 72 godziny rejestrowano obraz w hodowli komórek.

Materiały oznaczone jako T-AP, TK-AP, AHT-M, CHMT-M obniżały zawartość jonów wapniowych w po-

## EVALUATION OF IN VITRO CYTOCOMPATIBILITY OF CERAMIC BONE SUBSTITUTES BASED ON $\alpha$ -TCP

MAGDALENA NOGA<sup>1</sup>, RADOSŁAW OLKOWSKI<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL<sup>1</sup>, DOMINIKA SIEK<sup>2</sup>,  
JOANNA CZECHOWSKA<sup>2</sup>, ANETA ZIMA<sup>2</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY,  
CENTER FOR BIOSTRUCTURE RESEARCH,  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
5 CHAŁUBIŃSKIEGO STR., 02-004 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup>FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS,  
AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 CRACOW, POLAND

### Abstract

Due to their mineralogical similarity to the inorganic component of bone and the ability to bond with bone tissue phosphates of calcium (CaPs) are a promising group of bone substitutes. In order to investigate cytocompatibility of potential implant materials there are a wide range of tests analyzing changes in cell membrane integrity, activity of enzymes associated with cell metabolism or the ability of cells to proliferation. A positive outcome of *in vitro* cytocompatibility allows to perform *in vivo* study of tested materials. The aim of this work was to evaluate *in vitro* cytocompatibility of bone cements based on calcium phosphate with  $\alpha$  crystal structure ( $\alpha$ -TCP).

Cytocompatibility of the following cement materials has been tested: T-AP (based on  $\alpha$ -TCP), TK-AP, TK-CM (based on  $\alpha$ -TCP-calcite) AHT-M, CHMT-M (based on  $\alpha$ -TCP and hydroxyapatite with addition of silver or magnesium).

MG-63 cell line has been used to investigate cytotoxicity of ceramics. MG-63 is human osteosarcoma cell line with phenotype of osteoblasts at an early stage of differentiation. All types of ceramic materials were seeded with MG-63 cells and after 48h of *in vitro* culture metabolic activity has been tested with XTT test. Some ceramic samples were also pre-incubated for 1 hour in the culture medium before seeding. In addition, media from culture and extracts from ceramics were collected and calcium ion concentration was measured.

MG63 cells were cultured with different concentrations of ceramic extracts (100% - complete extract, 50%, 25%, 12,5%, 0% - pure medium). After 24 and 48h metabolic activity of cells has been investigated with XTT test. Cells were also observed in light microscopy.

To investigate influence of ceramic materials on MG-63 cells continuous microscopic observation was performed. Cells were seeded into 48-well culture plates, then ceramic samples have been placed into wells and photos of wells were captured during 72 hours long cell culture.

Materials designated as T-AP, TK-AP, AHT-M and CHMT-M diminished calcium ion concentration in the culture medium, while TK-CM did not alter the calcium concentration.

MG-63 cells cultured directly on samples exhibited low metabolic activity in all cases. Pre-incubation of

żywcze hodowlanej. TK-CM nie zmieniał stężeń tych jonów w medium hodowlanym.

Komórki MG-63 hodowane bezpośrednio na próbkach ceramicznych wykazały niską aktywność metaboliczną na wszystkich zbadanych materiałach. Jednak preinkubacja materiałów w pożywce hodowlanej częściowo poprawiła przeżywalność komórek. Aktywność metaboliczna komórek hodowanych na materiałach T-AP, TK-AP i TK-CM poddanych preinkubacji wzrosła kilkukrotnie w stosunku do nieinkubowanych materiałów.

Wyciągi z badanych materiałów ceramicznych cechowały się wysoką cytozgodnością we wszystkich rozcieńczeniach badanych roztworów.

Obserwacja w czasie rzeczywistym komórek MG-63 hodowanych w obecności materiałów ceramicznych pokazała, że badane próbki nie miały negatywnego wpływu na zachowanie się i morfologię komórek.

Cytozgodność wszystkich badanych materiałów w hodowli komórek z ekstraktami z próbek ceramicznych pokazała, iż obniżenie stężenia jonów wapnia w pożywce hodowlanej nie miało negatywnego wpływu na przeżywalność i zachowanie się komórek MG63. Niska aktywność metaboliczna komórek w hodowli w bezpośrednim kontakcie w porównaniu z obserwacją w czasie rzeczywistym może wynikać z mniejszej objętości pożywki hodowlanej, a przez to większej ekspozycji komórek na nierównowagę jonową w medium hodowlanym. Przeżywalność komórek *in vitro* w kontakcie z materiałami ceramicznymi była znacznie wyższa w układach eksperymentalnych w większej objętości medium. Ponadto preinkubacja przebadanych próbek poprawiła aktywność metaboliczną komórek hodowanych na materiałach, co nasuwa możliwości optymalizacji warunków hodowli *in vitro*. Na podstawie wyników hodowli w bezpośrednim kontakcie z materiałami po wcześniejszej preinkubacji zauważono, że komórki hodowane na próbkach na bazie  $\alpha$ -TCP oraz  $\alpha$ -TCP i kalcytu charakteryzowały się większą przeżywalnością w porównaniu z komórkami wysianymi na materiałach opartych na  $\alpha$ -TCP i hydroksyapatycie.

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 90-91]

## Podziękowania

Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, projekt nr POIG.01.03.01-00-005/09.

materials in the medium partially enhanced cell survival. Extracts made of the examined materials are characterized by high cytocompatibility in all dilutions of tested solutions. Real-time observation of MG-63 cells cultured in the presence of ceramic materials did not reveal any negative impact of the samples on cell behavior and morphology.

We observed the difference between the results of cytotoxicity tests performed on direct and indirect contact *in vitro* culture. Cytocompatibility of extracts made of the tested ceramics showed that decreasing of the calcium ion concentration in the culture medium did not have negative influence on survival and the behavior of MG63 cells. Lower metabolic activity of cells cultured directly on materials in comparison with the real-time observation of culture may be due to a smaller volume of culture medium, and thus greater exposure of cells to an ionic imbalance in the culture medium. Cell survival in contact with the ceramic materials was significantly higher in the experimental system with a larger volume of medium. In addition, preincubation of tested samples improved the metabolic activity of cells cultured on the materials. Positive effect of sample pre-incubation in medium enables the possibility to optimize the culture conditions *in vitro*. The results of culture on the preincubated materials showed that cells seeded on the samples based on  $\alpha$ -TCP and  $\alpha$ -TCP and calcite exhibited higher survival compared to cells cultured on materials based on  $\alpha$ -TCP and hydroxyapatite.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 90-91]

## Acknowledgements

Work co-financed by European Union under the Innovative Economy Operational Programme, Project No. POIG.01.03.01-00-005/09.

## WPŁYW WARUNKÓW HODOWLI IN VITRO NA PRZEŻYWALNOŚĆ LUDZKICH KOMÓREK KOSTNYCH W KONTAKCIE Z MATERIAŁAMI CERAMICZNYMI

RADOSŁAW OLKOWSKI<sup>1</sup>, PIOTR KASZCZEWSKI<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL<sup>1</sup>, JOANNA CZECHOWSKA<sup>2</sup>,  
DOMINIKA SIEK<sup>2</sup>, DAWID PIJOCHA<sup>2</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII,  
CENTRUM BIOSTRUKTURY, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA

<sup>2</sup>WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

### Streszczenie

Celem pracy była ocena cytozgodności in vitro tworzyw ceramicznych, opracowanych jako materiał do wypełnienia ubytków kostnych. Określono wpływ warunków hodowli na efekt testów cytozgodności in vitro. Badania przeprowadzono na materiałach oznaczonych jako: SH, SPR (komercyjne preparaty handlowe), TC-C oraz TC-MP (materiały oparte na  $\alpha$ -TCP), KMC-C (substytuty kostne na bazie hydroksyapatytu i siarczynu (VI) wapnia) oraz HCM, HMPM (materiały na bazie  $MgO$ ,  $NH_4H_2PO_4$ , hydroksyapatytu oraz siarczynu (VI) wapnia lub pirofosforanu sodu).

Do badań cytozgodności wykorzystano ludzkie komórki wyizolowane z tkanki kostnej (human bone-derived cells - hBDC). Zastosowano trzy różne sposoby hodowli in vitro: hodowlę komórek bezpośrednio na powierzchni próbek ceramicznych, hodowlę w pożywce wzbogaconej w wyciągi z materiałów ceramicznych, a także hodowlę komórek na TCPS w sąsiedztwie próbek ceramicznych. Hodowlę komórek na powierzchni próbek przeprowadzono w dwóch różnych warunkach: przy objętości 1 ml pożywki lub 0,2 ml pożywki. Pomiar aktywności metabolicznej komórek wykonano za pomocą testów XTT i Alamar Blue. Żywe i martwe komórki zostały uwidocznione przez barwienie zestawem Live/Dead i obserwację w mikroskopie fluorescencyjnym. Przeprowadzono także mikroskopową obserwację komórek oraz przyżyciową mikroskopową obserwację z dokumentacją fotograficzną w trybie poklatkowym. W wyciągach z materiałów ceramicznych oznaczono stężenie jonów wapnia.

Materiały SPR, HCM i KMC-C zwiększyły stężenie jonów wapnia w medium hodowlanym, a także uległy najsilniejszej degradacji w czasie inkubacji. Materiały SH, HMPM, TC-C i TC-MP obniżyły zawartość wapnia w DMEM.

Jedynie wyciągi z materiału HCM były cytotoksyczne w każdym z badanych stężeń (3, 13%-100%). Ponadto pełne (100%) wyciągi z materiałów SH, HMPM, KMC-C i TC-C były toksyczne dla komórek. Pozostałe rozcieńczenia wyciągów nie wykazały właściwości cytotoksycznych. Komórki były liczne i miały prawidłową morfologię ludzkich osteoblastów we wszystkich badanych stężeniach wyciągów.

Dla części materiałów (SH, HMPM, TC-C, TC-MP) żywotność komórek hodowanych na ich powierzchni znajduje się na poziomie kontroli (TCPS) przy objętości pożywki równej 1 ml, natomiast przy objętości

## CONDITIONS OF IN VITRO CULTURE INFLUENCE THE VIABILITY OF HUMAN BONE CELLS CULTURED WITH CERAMIC MATERIALS

RADOSŁAW OLKOWSKI<sup>1</sup>, PIOTR KASZCZEWSKI<sup>1</sup>,  
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL<sup>1</sup>, JOANNA CZECHOWSKA<sup>2</sup>,  
DOMINIKA SIEK<sup>2</sup>, DAWID PIJOCHA<sup>2</sup>, ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY,  
CENTER FOR BIOSTRUCTURE RESEARCH,  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
5 CHAŁUBIŃSKIEGO STR., 02-004 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup>FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS,  
AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

### Abstract

Analysis of biocompatibility in vitro of ceramic materials, projected as substitutes for bone tissue was the aim of the work. Influence of culture conditions on the materials cytocompatibility was also examined. Tests were performed on the materials described as: SH, SPR (commercial materials), TC-C and TC-MP (materials based on  $\alpha$ -TCP), KMC-C (bone substitutes based on hydroxyapatite and calcium sulfate) and HCM, HMPM (materials based on  $MgO$ ,  $NH_4H_2PO_4$ , hydroxyapatite and calcium sulfate or sodium pyrophosphate).

Human bone-derived cells (hBDC) were used for cytotoxicity assays. Three procedures of in vitro culture were applied: cell culture directly on the samples' surface, culture in the medium supplemented with extracts made of the materials, and cell culture on tissue culture-treated polystyrene (TCPS) next to ceramic samples. Culture of cells directly seeded on samples was performed in two ways: with 1 ml of culture medium (24-well culture plate) or 0,2 ml of medium (96-well plate). Metabolic activity of cells was measured by XTT test and Alamar Blue test. Cells were visualized by Live/Dead staining and cell fluorescence was observed in microscope. Microscopic observation of cells and long-term observation with time-lapse picture acquisition were also performed. Calcium ion concentration was measured in extracts.

Materials: SPR, HCM and KMC-C upgrade calcium concentration in culture medium and undergo the most intensive degradation. Materials: SH, HMPM, TC-C and TC-MP lower calcium concentration in DMEM.

Only HCM extracts were toxic in all dilutions (3, 13-100%). Moreover, full extracts (100%) made of SH, HMPM, KMC-C and TC-C were cytotoxic. Other dilutions were nontoxic. hBDC were numerous and well spread in all examined dilutions of extracts.

For some materials (SH, HMPM, TC-C, TC-MP) viability of hBDC cultured on their surface in 1 ml of medium equals the control (TCPS), but in 0,2 ml of culture medium cell viability reach 31% of control in the extreme. Living as well as dead cells are present on the materials surface. hBDC cultured on TCPS next to ceramic samples adhere, migrate, proliferate and maintain the regular morphology.

Volume of culture medium is crucial factor for survival of cell cultured in vitro in contact with biomaterials



0,2 ml żywotność komórek nie przekraczała 31% kontroli. Uwidoczniono obecność zarówno żywych, jak i martwych komórek na powierzchni materiałów. Komórki hodowane na TCPS w sąsiedztwie ceramiki, przylegają do podłoża, migrują i proliferują zachowując prawidłową morfologię.

Wykazano, że objętość pożywki hodowlanej ma decydujące znaczenie dla przeżywalności komórek w hodowli. Cytotoksyczne oddziaływanie materiału jest szczególnie intensywne w przypadku hodowli komórek w bezpośrednim kontakcie na jego powierzchni, podczas gdy w hodowli z wyciągami z badanych materiałów komórki zachowują wysoką przeżywalność. Żaden z badanych materiałów nie stanowi dobrego podłoża do hodowli komórek w warunkach bezpośredniego zasiedlania powierzchni materiału. Warunki hodowli stosowane przy ocenie cytozgodności wywierają znaczny wpływ na wynik badania, zatem dla uzyskania wiarygodnych wyników sugerowane jest zastosowanie kilku wariantów hodowli *in vitro*.

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 92-93]

## Podziękowania

Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, projekt nr POIG.01.03.01-00-005/09.

## WPŁYW MODYFIKACJI WARUNKÓW EKSPERYMENTALNYCH NA HODOWLĘ LUDZKICH KOMÓREK OSTEOTENNYCH NA MIKROPOROWATEJ BIOCERAMICE HYDROKSYAPATYTOWEJ

MAŁGORZATA KOŁODZIEJCZYK-MIERZYŃSKA<sup>1</sup>, ANNA CHRÓŚCICKA<sup>1</sup>, ZOFIA PASZKIEWICZ<sup>2</sup>, ANETA ZIMA<sup>2</sup>, ANNA ŚŁÓSARCZYK<sup>2</sup>, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII, CENTRUM BIOSTRUKTURY, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

<sup>2</sup>WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 93-94]

## Wstęp

Biomateriały na bazie ceramiki hydroksyapatytowej są szeroko wykorzystywane jako materiały implantacyjne w uzupełnianiu ubytków kostnych oraz jako podłoża w inżynierii tkankowej. Celem tej pracy była modyfikacja układu eksperymentalnego, umożliwiająca hodowlę ludzkich komórek osteogennych na podłożu mikroporowatej bioceramiki hydroksyapatytowej (HAp/M) o wysokiej porowatości otwartej (64%) i średniej wielkości porów w zakresie od 0,05 do 0,12 µm.

that change the calcium concentration. Cytotoxic impact of ceramic is especially intensive for cell cultured in direct contact with its surface. In the culture with extracts of the examined materials cells maintain high viability. None of examined materials is proper support for cell culture in direct contact. Results of cytotoxicity estimation depends on the conditions used for *in vitro* culture. Using various variants of *in vitro* culture is suggested to gain reliably results.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 92-93]

## Acknowledgements

Work co-financed by European Union under the Innovative Economy Operational Programme, Project No. POIG.01.03.01-00-005/09.

## EFFECT OF MODIFICATION OF EXPERIMENTAL CONDITIONS ON THE CULTURE OF HUMAN OSTEOGENIC CELLS ON MICROPOROUS HYDROXYAPATITE BIOCERAMIC

MAŁGORZATA KOŁODZIEJCZYK-MIERZYŃSKA<sup>1</sup>, ANNA CHRÓŚCICKA<sup>1</sup>, ZOFIA PASZKIEWICZ<sup>2</sup>, ANETA ZIMA<sup>2</sup>, ANNA ŚŁÓSARCZYK<sup>2</sup>, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY, CENTER FOR BIOSTRUCTURE RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, 5 CHALUBIŃSKIEGO STR., 02-004 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup>FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 KRAKOW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 93-94]

## Introduction

Biomaterials based on hydroxyapatite ceramics are widely used as implant materials in the regeneration of bone defects and also in the field of tissue engineering.

The aim of this study was optimization of the experimental system that allows culture of the human osteogenic cells on the surface of the microporous hydroxyapatite bioceramic (HAp/M) with high open porosity (64%) and average pore size ranging from 0,05 to 0,12 µm.

W pierwszym eksperymencie próbki HAp/M inkubowano przez dwa dni w roztworach PBS zawierających różne stężenia jonów wapniowych, część z tych roztworów dodatkowo zawierała 10% FBS (Fetal Bovine Serum/surowica bydlęca). Łącznie testowano pięć układów doświadczalnych. Następnie na próbki wysiano ludzkie komórki izolowane z tkanki kostnej (hBDC) i hodowano je przez 48h. Hodowle prowadzono w standardowych warunkach i medium hodowlanym, w jednym z wariantów doświadczalnych zastosowano medium zmodyfikowane dodatkiem jonów wapniowych. Na podstawie obserwacji morfologicznych (wykorzystując barwienia oceniające obecność żywych i martwych komórek) oraz poziomu wapnia w supernatancie wytypowano układ doświadczalny do dalszych analiz. W kolejnym eksperymencie preinkubację materiałów wydłużono do 4 dni, a hodowlę komórek prowadzono przez 7 kolejnych dni. Dodatkowo wykonano testy oceniające aktywność metaboliczną komórek (test XTT), liczebność (test PicoGreen) oraz ocenę morfologiczną komórek. Komórki hodowane na standardowej powierzchni hodowlanej (TCPS – tissue culture polystyrene) traktowano jako kontrolę.

## Wyniki i dyskusja

W pierwszym eksperymencie, po dwóch dniach hodowli hBDC na badanym materiale stwierdzono, że w czterech z pięciu testowanych wariantów doświadczalnych komórki przylegają do badanej powierzchni, ale nie rozplaszczają się na niej. W tych wariantach stwierdzono istotne obniżenie stężenia jonów wapnia w medium. Natomiast w hodowli z dodatkiem jonów wapnia do medium hodowlanego obserwowano rozplaszczone komórki na powierzchni materiałów. Ich morfologia była porównywalna z komórkami kontrolnymi. W kolejnym eksperymencie komórki nie tylko przylegały i rozplaszczają się na powierzchni próbki, ale także charakteryzowały się prawidłowym obrazem morfologicznym. Po 7 dniach hodowli nadal obserwowano żywe, prawidłowo rozplaszczone komórki na powierzchni materiału HAp/M. Stwierdzono również, że komórki zasiedliły całą dostępną powierzchnię, osiągając pełną konfluencję. Prawidłowo rozplaszczone komórki obserwowano również na spodniej stronie próbki. Wyniki testu XTT potwierdziły wysoką aktywność metaboliczną tych komórek, a ich liczebność była porównywalna z kontrolą (test PicoGreen). Stwierdzono również wyraźny wzrost liczebności komórek pomiędzy 2 a 7 dniem hodowli.

## Podsumowanie

Wykazana we wstępnych eksperymentach negatywna reakcja komórek na hodowlę w kontakcie z materiałem HAp/M nie oznacza, że materiał ten jest cytotoksyczny. Powoduje on natomiast istotne zmiany w składzie jonowym medium hodowlanego, które negatywnie wpływają na zachowanie komórek hBDC. Odpowiednia modyfikacja układu eksperymentalnego umożliwia hodowlę komórek osteogennych w bezpośrednim kontakcie z materiałem HAp/M. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że materiał ten jest biogodny i dobrze tolerowany przez ludzkie komórki osteogenne pod warunkiem zachowania odpowiednich warunków hodowlanych.

## Podziękowanie

Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, projekt nr POIG.01.03.01-00-005/09

## Materials and methods

In the first experiment, the HAp/M samples were incubated for two days in the PBS solution, with a different calcium ion concentration. Part of the PBS solutions was additionally supplemented with 10% of FBS (Fetal Bovine Serum). Totally it was 5 different experimental settings. Next, human bone derived cells (hBDC) were seeded on the HAp/M samples and cultured for a 48h. The cells were cultured at standard conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub> in humidified atmosphere) and in a standard culture medium, except one case where culture medium was modified by adding calcium ions. Based on the morphological observation (fluorescent live/dead staining) and calcium concentration in the supernatant, one experimental setup was chosen to the future analysis. In the following experiment the preincubation time was extended to four days and the cells were cultured for up to 7 days. Additionally, the XTT test (metabolic activity), PicoGreen test (DNA content/cell number) and cell morphology were analyzed. The cells culture on the tissue culture polystyrene (TCPS) were used as a control.

## Results and discussion

In the first experiment, after two days of hBDC culture on the HAp/M surface, in four experimental settings cells adhered to the culture surfaces but didn't spread. In this cases the significant decreasing of calcium ions concentration was observed in the culture medium. However, in the experimental setting where culture medium was modified by adding calcium ions the hBDC cells were spread on the HAp/M surface. Their morphology was similar to the control cells. In the next experiment the hBDC adhered, spread on the HAp/M surface and their morphology was typical for hBDC. After 7 days of cell culture we could still observe live cells spread on the surface of HAp/M samples. Spread cells were observed even on the bottom side of examined samples. The results of the XTT test confirmed normal metabolic activity of the cells and the cell number was comparable with the control (PicoGreen test). Moreover we observed significant increase in cell number between day 2 and 7 of culture.

## Conclusions

Even though preliminary experiment showed negative response of cells in contact with HAp/M it does not indicate its cytotoxic properties. The material significantly changes the ionic composition of culture medium and in consequence negatively influences on behavior of hBDC. Proper modification of the experimental system allows the culture of the osteogenic cells in a direct contact with the HAp/M material. It can be concluded that the HAp/M material is biocompatible and well tolerated by human osteogenic cells but only after proper modification of the culture conditions.

## Acknowledgment

*This work was supported by the European Regional Development Fund within the Innovative Economy Operational Programme, Grant No POIG.01.03.01-00-005/09.*

# MINERALIZACJA ENZYMATYCZNA HYDROŻELI Z GUMY GELLAN Z WYTWORZENIEM FOSFORANÓW WAPNIA ORAZ MAGNEZU DLA INŻYNIERII TKANKI KOSTNEJ

TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ KRAWCZYK<sup>2</sup>, ELZBIETA PAMULA<sup>2</sup>, HEIDI A. DECLERCQ<sup>3</sup>, DAVID SCHAUBROECK<sup>4</sup>, MIROSLAW M. BUCKO<sup>2</sup>, LIEVE BALCAEN<sup>5</sup>, PASCAL VAN DER VOORT<sup>6</sup>, FRANK VANHAECKE<sup>5</sup>, RIA CORNELISSEN<sup>3</sup>, PETER DUBRUEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GENT, BELGIA

<sup>2</sup>KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AGH, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF BASIC MEDICAL SCIENCE, GHENT UNIVERSITY, DE PINTELAAN 185 (6B3), 9000 GHENT, BELGIA

<sup>4</sup>OŚRODEK INŻYNIERII MIKROSYSTEMÓW (CMST), ELIS, IMEC, TECHNOLOGIEPARK 914A, 9052 GHENT, BELGIA

<sup>5</sup>WYDZIAŁ CHEMII ANALITYCZNEJ, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S12, 9000 GHENT, BELGIA

<sup>6</sup>WYDZIAŁ CHEMII NIEORGANICZNEJ, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S3, 9000 GHENT, BELGIA

\*MAILTO: TIMOTHY.DOUGLAS@UGENT.BE

## Streszczenie

Zastosowanie hydrożeli jako szkieletów dla inżynierii tkanki kostnej umożliwia integrację substancji bioaktywnej takiej jak enzym fosfataza alkaliczna (ALP), który sprzyja mineralizacji. W niniejszej pracy, hydrożele z gumy gellan (GG) zawierające ALP poddano mineralizacji z wytworzeniem fosforanów wapnia (CaP) i magnezu (MgP) przez inkubację w płynach mineralizujących zawierających glicerofosforan wapniowy (CaGP) i magnezowy (MgGP). Porównano pięć różnych stosunków stężeń CaGP:MgGP, mianowicie 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 oraz 0:0.1 (mol dm<sup>-3</sup>). Tworzenie CaP i MgP potwierdzono za pomocą FTIR, spektroskopii Ramana, SEM, EDS, ICP-OES, XRD, TGA oraz poprzez wyznaczanie zmian suchej masy. Stwierdzono, że wapń ulega integracji w fazie mineralnej w znacznie większym stopniu niż magnez. Wzrost ilości magnezu spowodował zmiany w morfologii otrzymanej fazy mineralnej. Badania mechaniczne oraz reometryczne wykazały, że moduł Younga oraz składowa rzeczywista modułu reometrycznego hydrożeli ulegających mineralizacji przy stosunkach stężeń CaGP:MgGP 0:0.1 były przynajmniej trzy razy większe w porównaniu do wszystkich innych próbek. Obecność MgP w próbkach zmineralizowanych sprzyjała adhezji oraz żywotności komórek osteoblastycznych MC3T3-E1 i nie wpłynęła negatywnie na ich cytozgodność. Wyniki dowodzą, że można indukować mineralizację hydrożeli z gumy gellan za pomocą CaGP oraz MgGP i tym samym wpływać na skład mineralny oraz właściwości mechaniczne kompozytów hydrożelowych-ceramicznych przez zmodyfikowanie stosunków stężeń CaGP:MgGP.

**Słowa kluczowe:** hydrożel, kompozyt, mineralizacja, enzym

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 95-98]

# ENZYMATIC MINERALIZATION OF GELLAN GUM HYDROGELS WITH CALCIUM AND MAGNESIUM PHOSPHATE FOR BONE TISSUE ENGINEERING

TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ KRAWCZYK<sup>2</sup>, ELZBIETA PAMULA<sup>2</sup>, HEIDI A. DECLERCQ<sup>3</sup>, DAVID SCHAUBROECK<sup>4</sup>, MIROSLAW M. BUCKO<sup>2</sup>, LIEVE BALCAEN<sup>5</sup>, PASCAL VAN DER VOORT<sup>6</sup>, FRANK VANHAECKE<sup>5</sup>, RIA CORNELISSEN<sup>3</sup>, PETER DUBRUEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GENT, BELGIUM

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY, KRAKOW, POLAND

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF BASIC MEDICAL SCIENCE, GHENT UNIVERSITY, DE PINTELAAN 185 (6B3), 9000 GHENT, BELGIUM

<sup>4</sup>CENTER FOR MICROSYSTEMS TECHNOLOGY (CMST), ELIS, IMEC, TECHNOLOGIEPARK 914A, 9052 GHENT, BELGIUM

<sup>5</sup>DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S12, 9000 GHENT, BELGIUM

<sup>6</sup>DEPARTMENT OF INORGANIC CHEMISTRY, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S3, 9000 GHENT, BELGIUM

\*MAILTO: TIMOTHY.DOUGLAS@UGENT.BE

## Abstract

The use of hydrogels as bone tissue engineering (TE) scaffolds enables incorporation of bioactive substances such as the mineralization-promoting enzyme alkaline phosphatase (ALP). In this study, gellan gum (GG) hydrogels containing ALP were mineralized with calcium phosphate (CaP) and magnesium phosphate (MgP) by incubation in mineralization solutions of calcium and magnesium glycerophosphate (CaGP, MgGP). Five different CaGP:MgGP concentration ratios were compared, namely 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 and 0:0.1 (all values mol dm<sup>-3</sup>). CaP and MgP formation was confirmed by FTIR, Raman, SEM, EDS, ICP-OES, XRD, TGA and monitoring dry mass percentage changes. Ca was incorporated into mineral to a greater extent than Mg. Incorporation of increasing amounts of Mg into mineral formed led to changes in mineral deposit morphology. Mechanical and rheometric testing revealed that Young's modulus and storage modulus of hydrogels mineralized at a CaGP:MgGP concentration ratios of 0:0.1 were at least three times higher than those of all other samples. The presence of MgP in mineralized samples promoted attachment and vitality of osteoblastic MC3T3-E1 cells and did not negatively impact cytocompatibility. The results prove the principle of enzymatic mineralization with CaP and MgP and adjusting the composition and mechanical properties of hydrogel-ceramic composites by altering the CaGP:MgGP concentration ratio.

**Keywords:** hydrogel, composite, mineralization, enzyme

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 95-98]



Mineralizacja hydrożeli jest bardzo pożądana w przypadku zastosowań związanych z regeneracją tkanki kostnej, gdyż poprawia ona bioaktywność hydrożeli, tzn. sprzyja tworzeniu się wiązań chemicznych z otaczającą tkanką kostną [1]. Ten cel daje się osiągnąć przez dodanie enzymu fosfatazy alkalicznej (ALP) [2], który indukuje mineralizację hydrożeli z wytworzeniem fosforanów wapnia (CaP) po inkubacji w roztworach zawierających wapń i glicerofosforan wapnia (CaGP) [3]. Mineralizacja enzymatyczna z wytworzeniem fosforanu magnezu (MgP) jest do tej pory mało przebadana, aczkolwiek MgP wykazuje porównywalną cytozgodność oraz zdolność do sprzyjania adhezji oraz zróżnicowania osteoblastów [4]. W niniejszej pracy indukowano mineralizację enzymatyczną hydrożeli z gumy gellan (GG), aby w przyszłości zastosować je jako hydrożelowe skafoldy dla inżynierii tkankowej [5]. Mineralizację z wytworzeniem CaP, MgP i kombinacjami CaP i MgP indukowano przez inkubację w roztworach CaGP i glicerofosforanu magnezu (MgGP) o różnych stężeniach stężeń CaGP:MgGP. Zmineralizowane hydrożele poddano analizie fizykochemicznej odnośnie ilości i składu chemicznego wytworzonego minerału, zbadano ich właściwości mechaniczne, oraz scharakteryzowano ich właściwości biologiczne w kontakcie z osteoblastami.

## Metodyka

Hydrożele GG zawierające ALP przygotowano przez ogrzewanie roztworu GG do 90°C i dodanie  $\text{CaCl}_2$  jako środka sieciującego [5]. Po ochłodzeniu do 50°C dodano ALP i roztwór odlewano w temperaturze pokojowej na szalki Petriego i po zżelowaniu wycinano próbki hydrożelowe w kształcie walców za pomocą wykrojnika. Mineralizację żeli indukowaną przez inkubację przez 7 d w płynach mineralizujących o różnych stężeniach CaGP i MgGP. Porównano pięć różnych stosunków stężeń CaGP:MgGP, mianowicie 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 i 0:0.1 M. Płyn mineralizujący wymieniano codziennie. Po zakończeniu mineralizacji, żele przemyto trzykrotnie w wodzie Milli-Q i następnie inkubowano w wodzie MilliQ przez 1 d aby usunąć pozostałości CaGP lub/i MgGP. Suchą masę, to znaczy część żelu nie zawierającą wody, obliczono według następującego wzoru: (masa po inkubacji i liofilizacji/masa po inkubacji przed liofilizacją)\*100. Parametr ten służył jako miara ilości wytworzonej fazy mineralnej. Ilość fazy mineralnej w próbkach zliofilizowanych określono w badaniach TGA. Tworzenie CaP oraz MgP wykazano za pomocą FTIR, spektroskopii Ramana, XRD, SEM oraz ICP-OES. Właściwości mechaniczne zmineralizowanych hydrożeli przebadano w próbie ściskania oraz za pomocą reometrii.

Cytozgodność oceniono przez określenie żywotności ludzkich komórek fibroblastycznych HFF-1 hodując je w ekstrakcie z próbek hydrożelowych za pomocą testu MTT. Adhezję i proliferację oceniono używając komórek linii osteoblastycznej MC3T3-E1 (100000 komórek/próbkę). Liczbę komórek oceniono 1 d i 11 d po zasiedlaniu za pomocą testu MTT. Przyleganie komórek oceniono przez barwienie komórek żywych i martwych (live/dead).

## Wyniki i dyskusja

Tworzenie się fazy mineralnej w hydrożelach w obecności ALP wykazano bezpośrednio przez badania FTIR, spektroskopii Ramana, XRD, SEM, EDS i ICP-OES, oraz pośrednio przez wzrost suchej masy w próbkach zawierających ALP oraz wzrost proporcji masy przypisanej do mi-

## Introduction

In order to promote hydrogels' bioactivity, i.e. the formation of a chemical bond with surrounding bone tissue after implantation [1] mineralization is desirable for bone regeneration applications. This can be achieved by adding the enzyme alkaline phosphatase (ALP) [2], which induces hydrogels' mineralization with calcium phosphate (CaP) after incubation in solutions containing calcium and glycerophosphate (GP) [3]. Enzymatic mineralization with magnesium phosphate (MgP) remains unexplored, although MgP has comparable cytocompatibility and ability to support osteoblast adhesion and differentiation [4]. In this study, enzymatic mineralization of gellan gum (GG) hydrogels, which has been applied in hydrogel form as a tissue engineering (TE) scaffold [5], with CaP, MgP and combinations thereof was induced by incubation in solutions of CaGP and magnesium glycerophosphate (MgGP) and variation of the CaGP:MgGP concentration ratio. Mineralized gels were characterized physicochemically with respect to amount and nature of mineral formed and mechanical properties, as well as cell biologically using osteoblasts.

## Materials and methods

GG hydrogels containing ALP were prepared by heating GG solution to 90°C and addition of  $\text{CaCl}_2$  as crosslinker [5]. After cooling to 50°C ALP was added, the solution was cast at room temperature and cylindrical hydrogels samples were cut out with a hole punch. Gel mineralization was induced by incubation in mineralization medium for 7 d containing different concentrations of CaGP and MgGP. Five different CaGP:MgGP concentration ratios were compared, namely 0.1:0, 0.075:0.025, 0.05:0.05, 0.025:0.075 and 0:0.1 M. Mineralization medium was changed every day. After conclusion of mineralization, gels were rinsed three times in Milli-Q water and subsequently incubated in Milli-Q for 1 d with the aim of removing residual CaGP and MgGP. The dry mass percentage, i.e. the gel weight percentage not consisting of water, was calculated as: (weight after incubation and subsequent freeze-drying/weight after incubation but before freeze-drying)\*100. This served as a measure of the extent of mineral formation. Amount of mineral in freeze-dried samples was determined by TGA. Formation of CaP and MgP was demonstrated by FTIR, Raman, XRD, SEM, EDS and ICP-OES. Mechanical properties were investigated by compressive testing and rheometry.

Cytocompatibility was evaluated by determining the viability of human fibroblastic cells HFF-1 after culture in eluate from hydrogel samples using the MTT Assay. Adhesion and proliferation were assessed using cells of the osteoblastic cell line MC3T3-E1 (100000 cells/sample) Cell number was evaluated 1 d and 11 d post-seeding using the MTT Assay. Cell attachment was evaluated using live/dead staining.

## Results and discussions

The formation of mineral in hydrogels in the presence of ALP was demonstrated directly by FTIR, Raman, XRD, SEM, EDS and ICP-OES, and indirectly by the increases in dry mass percentages in samples containing ALP and increases in the mass fraction attributable to mineral measured by TGA, and increased Young's Modulus and rheometric storage modulus.

EDS and ICP-OES measurements, as well as comparison of dry mass percentages and TGA data indicated that more Ca was incorporated into mineral formed than Mg. This was supported by the fact that morphology visualized

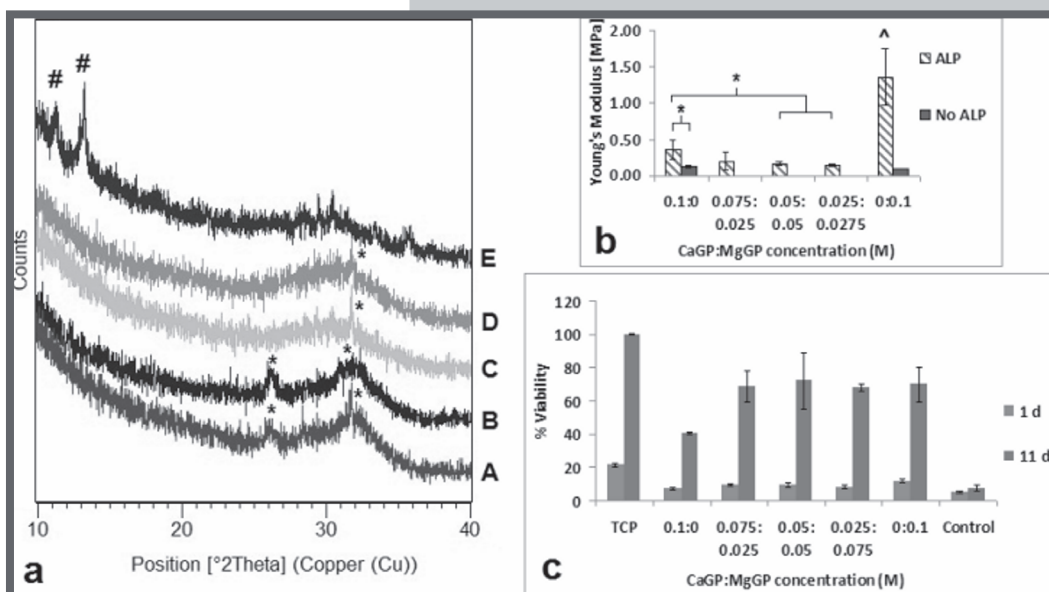
nerału jaki stwierdzono w badaniach TGA, oraz podwyższonego modułu Younga i składowej rzeczywistej modułu reometrycznego.

Pomiary EDS i IC-P-OES oraz porównanie suchej masy i wyników TGA wykazały, że w uzyskanej fazie mineralnej zostało zintegrowane więcej wapnia niż magnezu. Poza tym, minerały wytworzone w płynach mineralizujących zawierających CaGP i MgGP były bardziej podobne do CaP niż MgP, co stwierdzono w badaniach SEM wizualizujących morfologię wydzieleń oraz w badaniach spektroskopowych (FTIR, Raman) i XRD (RYS.a). W dyfraktogramach XRD zaobserwowano charakterystyczne refleksy dla apatytu przy  $26^\circ$  i  $32^\circ$  w grupach 0.1:0 i 0.075:0.025 (A, B). W grupach 0.05:0.05 i 0.025:0.075 (C, D), zaobserwowano tylko refleks przy  $32^\circ$ . Dyfraktogram grupy 0:0.1 (E) znacznie się różnił: refleksy charakterystyczne dla bobierytu  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  zaobserwowano przy  $11^\circ$  i  $13^\circ$ .

Badania właściwości mechanicznych w próbie ściskania hydrożeli zawierających ALP (RYS/.b) po 7 d inkubacji w płynie mineralizującym wykazały wzrost modułu Younga. Moduł Younga próbek zawierających ALP zależał od składu płynu: grupy 0.1:0 i 0.075:0.025 były znacznie sztywniejsze niż grupy 0.05:0.05 i 0.025:0.075. Moduł Younga próbek w grupie 0:0.1, inkubowanej w czystym MgGP, był przynajmniej trzy razy większy niż moduły próbek we wszystkich innych grupach. Barwienie live/dead oraz testowanie żywotności wykazały, że mineralizacja GG prowadziła do znacznie polepszonego przylegania żywych komórek (RYS.c). Obecność fazy mineralnej na powierzchni zmineralizowanego GG umożliwia adsorpcję białek z surowicy a więc sprzyja adhezji komórek. Po 1 d, zaobserwowano najwyższą żywotność na próbkach zmineralizowanych w stosunku stężeń CaGP:MgGP 0:0.1 i najniższą w stosunku 0.1:0. Po 11 d, żywotność była podobna na wszystkich próbkach z wyjątkiem grupy zmineralizowanej w stosunku stężeń CaGP:MgGP 0.1:0. W tej grupie żywotność była znacznie niższa (około 50-60% żywotności w odniesieniu do innych zmineralizowanych grup). Wyższa proliferacja na próbkach zawierających Mg spowodowana była stymulującym działaniem magnezu, co zostało już stwierdzone dla hydroksyapatytu zawierającego małą ilość magnezu [6].

## Wnioski

Tworzenie CaP i MgP w hydrożelach GG indukowano przez wprowadzenie ALP i następnie inkubację w roztwo-



**RYS.** Analiza GG hydrożeli zmineralizowanych w różnych stosunkach stężeń CaGP:MgGP : 0.1:0 (A), 0.075:0.025 (B), 0.05:0.05 (C), 0.025:0.075 (D) i 0:0.1 (E) M. (a) Analiza XRD. Zaznaczono charakterystyczne refleksy dla apatytu (\*) i bobierytu (#). (b) Wartości modułu Younga w próbie ściskania. ^:  $p < 0.001$  w odniesieniu do wszystkich innych grup; \*:  $p < 0.01$ . (c) Żywotność komórek MC3T3-E1 hodowlanych przez 1 i 11 d. GG bez ALP-a służył jako kontrola negatywna zaś polistyren służył jako kontrola pozytywna. **FIG.** Analysis of GG gels mineralized at different CaGP:MgGP concentrations: 0.1:0 (A), 0.075:0.025 (B), 0.05:0.05 (C), 0.025:0.075 (D) and 0:0.1 (E) M. (a) XRD analysis. Characteristic peaks are marked for apatite (\*) and bobierrite (#). (b) Determination of Young's Modulus by compressive testing. ^:  $p < 0.001$  relative to all other groups; \*:  $p < 0.01$ . Error bars show standard deviation. (c) Viability of MC3T3-E1 cells cultured for 1 d and 11. ALP-free GG served as a control. Tissue culture polystyrene served as a positive control. Error bars show standard deviation.

by SEM and FTIR, Raman and XRD spectra (FIG.a) of mineral formed in samples incubated in mineralization solutions containing CaGP resembled CaP more strongly than MgP. In XRD spectra, the 0.1:0 and 0.075:0.025 groups (A, B), peaks characteristic for apatite were observed at  $26^\circ$  and  $32^\circ$ . In the 0.05:0.05 and 0.025:0.075 groups (C, D), only the peak at  $32^\circ$  was observed. The diffractogram of the 0:0.1 group (E) was markedly different. Peaks characteristic for bobierrite  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  were seen at  $11^\circ$  and  $13^\circ$ .

Compressive testing of hydrogels (FIG.b) after 7 d incubation in mineralization solution revealed an increase in Young's modulus due to ALP incorporation. For samples containing ALP, Young's modulus was dependent on the medium composition. The 0.1:0 and 0.075:0.025 groups were significantly stiffer than the 0.05:0.05 and 0.025:0.075 groups. The Young's modulus of samples in the 0:0.1 group, incubated in pure MgGP, was at least three times higher than that of all other groups.

Enzymatic mineralization of GG led to far superior adhesion of viable cells, as demonstrated by live/dead staining and cell vitality testing (FIG.c). The presence of mineral on the surface of mineralized GG may enable serum protein adsorption and thus aid adhesion. After 1 d, viability was highest on samples mineralized at a CaGP:MgGP concentration ratio of 0:0.1 and lowest for the ratio 0.1:0. After 11 d, viability was similar on all samples except for the group mineralized at a CaGP:MgGP concentration ratio of 0.1:0, which displayed markedly lower viability (approximately 50-60% of viability for other mineralized groups). Higher proliferation on samples containing Mg might be caused by a stimulatory effect of Mg, reported for Mg-doped hydroxyapatite [6].

...rach CaGP i MgGP, przy czym tworzyło się relatywnie więcej fosforanów wapnia niż magnezu. Mineralizacja prowadziła do wzrostu sztywności hydrożeli, a największy jej wzrost stwierdzono w przypadku próbek inkubowanych w czystym roztworze MgGP. Obecność MgP w zmineralizowanych próbkach wpływała korzystnie na przyleganie i proliferację osteoblastów.

## Podziękowania

Autorzy dziękują Research Foundation Flanders (FWO) oraz Ghent University za sfinansowanie badań i LLP Erasmus program za przyznanie stypendium dla Grzegorza Krawczyka .

## Conclusions

CaP and MgP mineral formation in GG hydrogels was induced by incorporation of ALP subsequent incubation in solutions of CaGP and MgGP. Formation of CaP was favoured more strongly than MgP. Mineralization led to an increase in stiffness, which was greatest for samples incubated in pure MgGP solution. The presence of MgP in mineralized samples led to enhanced osteoblast attachment and proliferation.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the Research Foundation Flanders (FWO) and Ghent University for support.

## Piśmiennictwo

- [1] Legeros, R. Z. (1991) Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Basel, Karger.
- [2] Gkioni, K., (2010) Tissue Eng Part B Rev, 16, 577-85.
- [3] Douglas, T. E. L., et al. (2012) Macromol Biosci.

## References

- [4] Tamimi, F., et al. (2012) Acta Biomater, 7, 2678-85.
- [5] Oliveira, J. T., et al. (2010) J Biomed Mater Res A, 93, 852-63.
- [6] Bracci, B., et al. (2009) J Inorg Biochem, 103, 1666-74.





# MOŻLIWOŚCI APLIKACYJNE MODYFIKOWANYCH PROSZKÓW WĘGLOWYCH W PRZEMYSŁE FARMACEUTYCZNO- KOSMETYCZNYM

BEATA SKIBSKA<sup>1\*</sup>, KAZIMIERA HENRYKA BODEK<sup>1</sup>,  
MIRELLA BATORY<sup>2</sup>

UNIWERSYTET MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,  
UL. MUSZYŃSKIEGO 1, 90-151 ŁÓDŹ:

<sup>1</sup>KATEDRA FARMACJI STOSOWANEJ

<sup>2</sup>KATEDRA KOSMETOLOGII

\*MAILTO:BEATA.SKIBSKA@UMED.LODZ.PL

## Streszczenie

Najnowsze badania dotyczące nanomateriałów węglowych dla zastosowań w medycynie ujawniły, że modyfikowane nanoproszki węglowe są o wiele bardziej biologiczne niż wiele innych nanomateriałów. Ich nietoksyczny charakter oraz właściwości przeciwzapalne czynią je atrakcyjnymi dla różnych zastosowań zarówno w farmacji, jak i w kosmetologii. W naszej pracy przedstawiliśmy jedną z ważniejszych właściwości proszków węglowych otrzymywanych metodami: MW/RF PACVD, RF PACVD oraz detonacyjną, mianowicie: sposób rozproszenia w przygotowanych podłożach do podania na skórę oraz doustnie. Sprawdziliśmy, czy istnieje możliwość zastosowania ich nie tylko w preparatach mających wpływ na płaszcz hydro-lipidowy skóry, ale również w preparatach do podania doustnego jako nośniki leków. Przygotowano odpowiednie rodzaje podłoża, w których umieszczono poszczególne proszki węglowe. Uzyskane wyniki badań właściwości proszków węglowych otrzymanych różnymi metodami świadczą o ich szerokich możliwościach aplikacyjnych. Właściwości te w głównej mierze kształtowane są poprzez metodę syntezy. Hydrofobowe proszki wytwarzane metodami CVD i hydrofilowy proszek wytwarzany metodą detonacyjną mogą w różny sposób wpływać na płaszcz hydro-lipidowy skóry. Hydrofilowy proszek osiada na dno w badanym podłożu, a hydrofobowy występuje na powierzchni podłoża. W podłożu z 1 % roztworem metylcelulozy przeznaczonym do podania doustnego, proszek tworzy jednolitą zawiesinę. Istnieje zatem możliwość szerszego zastosowania proszków węglowych w przemyśle farmaceutycznym - kosmetycznym w preparatach mogących oddziaływać na płaszcz hydro-lipidowy skóry i do podawania doustnego jako nośniki leków.

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 99]

# POSSIBILITIES OF APPLICATION OF MODIFIED CARBON POWDERS INTO PHARMACEUTICAL AND COSMETIC INDUSTRIES

BEATA SKIBSKA<sup>1\*</sup>, KAZIMIERA HENRYKA BODEK<sup>1</sup>,  
MIRELLA BATORY<sup>2</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF PHARMACY,  
1 MUSZYŃSKIEGO STR., 90-151 LODZ, POLAND:

<sup>1</sup>CHAIR OF APPLIED PHARMACY

<sup>2</sup>CHAIR OF COSMETOLOGY

\*MAILTO:BEATA.SKIBSKA@UMED.LODZ.PL

## Abstract

Recent studies on carbon nanomaterials for biomedical applications revealed that modification carbon powders are much more biocompatible than most other carbon nanomaterials. Noncytotoxic nature of carbon powders and their anti-inflammatory properties makes carbon powders attractive for various pharmaceutical and cosmetic applications. In the study we present one of the most important properties of carbon powders produced by detonation, RF PACVD and MW/RF PACVD methods, namely: a distraction in the prepared surfaces to give "per os" and on the skin. We checked whether it is possible to use them not only in the preparations of the skin affecting the functions of the hydro-lipid skin coat, but also in the "per os" preparations as delivery drugs. Prepared the types of substrates, in which each placed carbon powders. On the basis of obtained research results it can be stated that carbon powders obtained by different methods of synthesis show their broad application possibilities. Different properties of carbon powders are mainly shaped by the method of synthesis and process parameters. The hydrophobic powders produced by CVD methods and the hydrophilic powder produced by detonation method may differently affect the hydro-lipid skin coat. The hydrophilic powder settles to the bottom in the test substrate, and the hydrophobic surface of the substrate occurs. In the substrate with 1% methylcellulose solution intended for oral administration, the powder forms a uniform suspension. Therefore there is a possibility of wider application of carbon powders in the pharmaceutical-cosmetic industry in the new group of preparations affecting the hydro-lipid skin coat properly matched to the particular skin type and condition and in the "per os" preparations as delivery drugs.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 99]

## Piśmiennictwo

[1] P. Niedzielski, Wytwarzanie i zastosowanie proszków diamentowych, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź 2011.

## References

[2] O. A. Shenderova, S. A. Ciftan Hens, Detonation Nanodiamond Particles Processing, Modification and Bioapplications, NANODIAMONDS. Applications in Biology and Nanoscale Medicine, D. Ho (red.), Springer, New York 2010.

# MODYFIKOWANE PREKURSOROWE WŁÓKNA POLIAKRYLONITRYLOWE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

MAGDALENA BRZEZIŃSKA\*, PAULINA KRÓL, MACIEJ BOGUŃ

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ TECHNOLOGII MATERIAŁOWYCH  
I WZORNICTWA TEKSTYLÓW, KATEDRA MATERIAŁOZNAWSTWA,  
TOWAROZNAWSTWA I METROLOGII WŁÓKIENNICZEJ,  
UL. ŻEROMSKIEGO 116, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA  
\*MAILTO: KOPEC.MAGDA.84@ONET.PL

## Streszczenie

*Opracowano warunki wytwarzania prekursorowych włókien poliakrylonitrylowych z nanododatkiem w postaci biokompatybilnego materiału wspomagającego odbudowę tkanki kostnej. Właściwości biokompatybilne uzyskuje się poprzez wprowadzenie do tworzywa włóknotwórczego, wollastonitu  $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ , w etapie sporządzania roztworu przędzalniczego. Zbadano wpływ podstawowych parametrów procesu formowania na właściwości wytrzymałościowe włókien, wyznaczono wydłużenie przy zerwaniu. Określono całkowitą objętość porów, wyznaczono sorpcję i retencję otrzymanych włókien.*

**Słowa kluczowe:** PAN, wollastonit, nanododatek, włókna

[Inżynieria Biomateriałów, 116-117, (2012), 100-103]

## Wprowadzenie

Obecnie bardzo prężnie rozwijającą się dziedziną nauki jest bioinżynieria. Stanowi ona połączenie wiedzy zlokalizowanej na pograniczu nauk technicznych, medycznych i biologicznych. Jednym z kierunków badań prowadzonych przez wiele ośrodków badawczych jest wykorzystywanie materiałów o specjalnych właściwościach w nowoczesnej medycynie. Do takich materiałów zalicza się wollastonit, który wprowadzony do tworzywa polimerowego nadaje mu funkcje bioaktywne, wspomagając leczenie. Dobór parametrów procesu wytwarzania włókien z poliakrylonitrylu pozwala na modyfikowanie tworzywa polimerowego, tak aby można było uzyskać włókna o krańcowo różnych właściwościach. Wynika to z powiązań i zależności jakie występują na poziomie i pomiędzy poszczególnymi etapami procesu technologicznego. Masa cząsteczkowa polimeru, rodzaj rozpuszczalnika użytego do sporządzania roztworu przędzalniczego, jego stężenie, warunki procesu zestalania, ukształtowanie etapu rozciągania, stabilizacji termicznej i suszenia, wszystkie te czynniki wpływają na przebieg procesu formowania i w konsekwencji określają strukturę i końcowe właściwości włókien. Zastosowanie nanododatku w postaci wollastonitu pozwala również na modyfikację włókien, nadając im dodatkowe, inne właściwości.

W wyniku pirolizy z włókien poliakrylonitrylowych otrzymywane są włókna węglowe [1]. W Polskim patencie PL121830 autorzy opisali dwie metody otrzymywania włókien węglowych z poliakrylonitrylu [2]. Na właściwości uzyskanych włókien węglowych ma wpływ wiele czynników, wśród których znajdują się m.in. właściwości włókien prekursorowych zależne od warunków technologicznych procesu formowania, struktury włókien [3] i charakteru wyjściowego kopolimeru. Literatura na ten temat podaje, że uzyskanie odpowiednich włókien węglowych [4] o wy-

# MODIFIED PRECURSOR POLYACRYLONITRILE FIBRES FOR MEDICAL APPLICATIONS

MAGDALENA BRZEZIŃSKA\*, PAULINA KRÓL, MACIEJ BOGUŃ

TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, FACULTY OF MATERIAL TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN, DEPARTMENT OF MATERIALS, COMMODITY AND TEXTILE METROLOGY  
116 ŻEROMSKIEGO STR., 90-924 ŁÓDŹ, POLAND  
\*MAILTO: KOPEC.MAGDA.84@ONET.PL

## Abstract

*Manufacturing conditions for precursor polyacrylonitrile fibres with a nanoadditive (a biocompatible material which facilitates bone tissue regeneration) have been developed. Biocompatibility is obtained by incorporating wollastonite  $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$  into the fibre-forming material during the preparation of the spinning solution. The effect has been investigated of basic spinning process parameters on fibre strength; elongation at break has been determined. Total pore volume, water sorption and retention of the resulting fibres have been determined.*

**Keywords:** PAN Wollastonite, nanoparticles, fibers  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 100-103]

## Introduction

Bioengineering is currently a field which is growing very dynamically. It combines knowledge at the border of technical, medical and biological sciences. The application of materials with special properties in modern medicine is one of research directions pursued by a number of research groups. Wollastonite is one of such materials; when incorporated into a polymer material, it makes it bioactive and supports therapies. Appropriate selection of the polyacrylonitrile fibre manufacturing process enables the modification of the polymer material, and fibres with extremely different properties can be formed. This results from relationships at the level of and between respective manufacturing process stages. Polymer molecular weight, type of solvent used for the spinning solution, its concentration, coagulation process conditions, drawing, thermal stabilisation and drying stage conditions: all these factors affect the spinning process; in consequence, they determine fibre structure and final properties. When wollastonite as a nanoadditive is used, fibres can be modified and take on additional and distinct properties.

Carbon fibres are obtained by the pyrolysis of polyacrylonitrile fibres [1]. Polish patent PL121830 discloses two manufacturing processes for carbon fibres from polyacrylonitrile [2]. A number of factors influence the properties of resulting carbon fibres, such as precursor fibre properties which depend on spinning process technological conditions, fibre structure [3] and the nature of the starting copolymer. According to relevant literature, a polymer with higher molecular weight and appropriate polymolecularity has to be used to obtain required carbon fibres [4] with high tensile strength and suitable Young's modulus.

A number of research groups in Poland and abroad are currently involved in the investigation of the application of specific properties of natural substances which may facilitate the regeneration of damaged bone. An example is wollastonite, a silicate mineral composed of  $\text{SiO}_2$ —51.71%,  $\text{CaO}$ —48.29% with minor impurities (iron, manganese and

sokich właściwościach wytrzymałościowych na rozrywanie i odpowiednim module Younga wymaga stosowania polimeru o wyższych masach cząsteczkowych i odpowiedniej polimolekularności.

Obecnie wiele ośrodków naukowych w kraju i za granicą prowadzi badania nad wykorzystaniem specyficznych właściwości naturalnych substancji, które mogą przyczynić się do odbudowy uszkodzonych kości. Przykładem może być wollastonit, który jest minerałem z rodziny krzemianów, zbudowany z  $\text{SiO}_2$ —51,71%,  $\text{CaO}$ —48,29% z niewielkimi zanieczyszczeniami w postaci tlenków żelaza, manganu i magnezu. Z wprowadzeniem do tworzywa prekursorowego PAN niewłóknotwórczego nanododatku może być związane zmniejszenie podatności na deformację [5,6]. Skutkiem może być obniżenie właściwości wytrzymałościowych włókien i zmniejszenie podatności na deformację w etapie rozciągu plastyfikacyjnego.

Rozciąg plastyfikacyjny typowy dla włókien poliakrylonitrylowych realizowany jest przeważnie dwuetapowo, ponieważ plastifikator wnika głównie do obszarów amorficznych przez co nie osiąga się w pierwszym etapie głębokiej przebudowy struktury. Zdolność do przebudowy jest silnie związana ze strukturą nadmolekularną wytworzoną w poprzednich etapach. Istotny jest więc stan agregacji pierwotnego włókna [7]. W przędzeniu włókien poliakrylonitrylowych z wollastonitem zastosowano dwuetapowy rozciąg, dążąc do jego maksymalnej wartości. Uzyskany efekt zmian właściwości wiąże się również z rodzajem wprowadzonego nanododatku i oddziaływaniem z polimerem. Nanododatki mają tendencję do aglomeracji, co również wpływa na końcową wytrzymałość produktu. Chcąc zapobiec aglomeracji nanododatku można zastosować jedną z metod rozbijania cząstek np. przy pomocy sondy ultradźwiękowej. W związku z tym włókna zawierające wollastonit wymagają odpowiedniego dobrania parametrów procesu wytwarzania, oraz dobrania odpowiednich parametrów obróbki końcowych włókien.

Celem pracy było modyfikowanie prekursorowych włókien PAN poprzez wprowadzenie do matrycy polimerowej wollastonitu i otrzymanie włókien o wysokich właściwościach wytrzymałościowych. Zbadany został wpływ podstawowych parametrów procesu formowania na właściwości i strukturę makroskopową otrzymanych włókien.

## Materiały i metody

Do sporządzenia roztworu przędzalniczego PAN w DMF stosowano kopolimer trójskładnikowy zawierający 93-94% wag. merów akrylonitrylu, 5-6% wag. merów akrylanu metylu oraz 1% wag. merów alilosulfonianu sodowego produkcji węgierskiej firmy Zoltek. Lepkość istotna kopolimeru wyznaczona w temp. 20°C w DMF-ie wynosiła 1,29 dl/g. Polidispersyjność wyznaczono metodą chromatografii żelowej i wyniosła  $M_w/M_n=3,1$ . Jako nanododatek stosowano  $\text{Ca}_2\text{Si}_2\text{O}_7$  AGH Kraków. Nanododatek wprowadzono do roztworu przędzalniczego w ilości 3% w przeliczeniu na polimer, po uprzednim działaniu ultradźwiękami na jego zawiesinę w rozpuszczalniku w czasie 15-30 minut w temp. 20°C. Do tego celu użyto sondy ultradźwiękowej Bandelin Sonoplus 2200 HD o mocy 200W.

Właściwości reologiczne roztworu PAN w DMF zawierającego  $\text{Ca}_2\text{Si}_2\text{O}_7$  oznaczono za pomocą reowiskozymetru Rheotest RV, przy szybkości ścinania do 146,8 1/s, w temperaturze 20°C przy użyciu cylindra „H”.

Włókna formowano metodą z roztworu na mokro przy zastosowaniu przędzarki wielolaboratoryjnej z możliwością stabilizacji założonych parametrów technologicznych i możliwości ich ciągłej kontroli. Zastosowano dyszę prze-

magnezium oxides). Reduced susceptibility to deformation may occur when a non-fibre-forming nanoadditive is incorporated into the PAN precursor material [5,6]. This may lead to reduced fibre strength and reduced susceptibility to deformation at the plasticization drawing stage.

Plasticization drawing typical of polyacrylonitrile is usually carried out in two stages, because the plasticiser penetrates mainly amorphous areas; therefore, deep structure rearrangement does not occur in the first stage. The rearrangement potential is strongly related to the supramolecular structure formed in previous stages. Therefore, the aggregation of the original fibre is crucial [7]. Two-stage drawing at the maximum value possible was used for spinning polyacrylonitrile fibres with wollastonite. The resulting effect of modified properties also depends on the type of nanoadditive used and interactions with the polymer. Nanoadditives tend to agglomerate, which also affects final product strength. To prevent nanoadditive agglomeration, one of methods for separating particles can be used, e.g. by an ultrasonic probe. Therefore, appropriate manufacturing process conditions and suitable final fibre processing parameters have to be selected for wollastonite-containing fibres.

The objective of the investigation has been to modify precursor PAN fibres by incorporating wollastonite into the polymer matrix and to obtain high-strength fibres. The effect was studied of basic spinning process parameters on the properties and macroscopic structure of resulting fibres.

## Materials and methods

A three-component copolymer was used to prepare the PAN spinning solution in DMF which contained 93-94 w/w% of acrylonitrile mers, 5-6 w/w% of methyl acrylate mers and 1 w/w% of sodium allylsulfonate mers from Zoltek, Hungary. Copolymer intrinsic viscosity at 20°C in DMF was 1.29 dl/g. Polydispersity determined by gel chromatography was  $M_w/M_n=3.1$ .  $\text{Ca}_2\text{Si}_2\text{O}_7$  from the Kraków University of Science and Technology was used as the nanoadditive. The nanoadditive was added to the spinning solution in an amount of 3% as per the polymer; polymer suspension in the solvent was previously sonicated for 15-30 minutes at 20°C. A Bandelin Sonoplus 2200 HD ultrasonic probe (power: 200W) was used.

Rheological properties of the PAN solution in DMF with  $\text{Ca}_2\text{Si}_2\text{O}_7$  were determined using a Rheotest RV viscometer at a shear rate of up to 146.8 1/s at 20°C using the H cylinder.

Fibres were formed by a wet spinning process using a large laboratory spinning machine with a feature of stabilised set manufacturing conditions and their continuous monitoring. A 240-hole spinning nozzle with a 0.08 mm diameter was used. The process of fibre coagulation was carried out in a bath which contained 60-70% aqueous DMF solution. The drawing process involved two stages: in the coagulation bath and in superheated steam at approx. 135°C. Two versions of draw distribution were used: maximum and optimum. Subsequently, the fibres were continuously rinsed and dried at approx. 20-40°C in isometric conditions.

The tenacity at break was determined for a fibre bundle according to Polish Standard PN-EN-ISO-268:1997 using an Instron tester.

Fibre porosity was determined by mercury porosimetry using a Carlo-Erba porosimeter coupled with a computer system which can determine total pore volume, percentage of up to 1000 nm pores and total internal pore area.

The sorption of water vapour by the fibres was determined according to Polish Standard PN-71/P-04653 at 65% and 100% relative air humidity.

Water retention was determined using a laboratory centrifuge at an acceleration of 10,000 m/s<sup>2</sup>. The retention value



dzalniczą o 240 otworkach o średnicy 0,08mm. Proces zestalania włókien prowadzony był w kąpeli składającej się z wodnego roztworu DMF-u o stężeniu 60-70%. Proces rozciągania realizowano dwuetapowo w kąpeli plastyfikacyjnej oraz w przegrzanej parze wodnej o temp. około 135°C. Zastosowano dwa warianty rozkładu rozciągów: maksymalny i optymalny. W dalszej kolejności prowadzony był proces płukania w sposób ciągły i suszenie w temperaturze około 20-40°C w warunkach izometrycznych.

Wytrzymałość właściwą przy zerwaniu wyznaczono dla wiązki włókien według Normy Polskiej PN-EN-ISO-268:1997 używając maszyny typu Instron.

Porowatość włókien oznaczono za pomocą metody porozymetrii rtęciowej stosując porozymetr Carlo-Erba połączony z systemem komputerowych, dający możliwość oznaczenia całkowitej objętości porów, udziału procentowego porów do 1000nm oraz całkowitej powierzchni wewnętrznej porów.

Sorpcja pary wodnej została oznaczona zgodnie z Polską Normą PN-71/P-04653 w warunkach 65% i 100% wilgotności względnej powietrza.

Retencję wody oznaczono wykorzystując wirówkę laboratoryjną z przyśpieszeniem 10tys. m/s<sup>2</sup>. Wartość retencji wyznaczono poprzez odniesienie masy wody pozostałej we włóknie po odwirowaniu do masy włókna wysuszonego.

## Wyniki i dyskusja

Chcąc uzyskać podwyższone właściwości wytrzymałościowe włókien PAN z udziałem nanododatku Ca<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>, proces zestalania prowadzony był w łagodnych warunkach przy zmiennej zawartości rozpuszczalnika w kąpeli w zakresie 60-70% w temperaturze rzędu 15-20°C. Zestalenie przebiegało według mechanizmu dyfuzyjnego co pozwoliło na uzyskanie struktury o niskim stopniu zdeformowania. Przyjęte parametry technologiczne były wyznaczone we wcześniejszych pracach [6,7]. Dla poszczególnych włókien z poliakrylonitrylu proces zestalania prowadzony był tak, aby uzyskać maksymalne właściwości wytrzymałości, przy podwyższonych właściwościach sorpcyjnych.

W tym celu zostały zaproponowane różne wyciągi filerowe (od -40% do +10%). Porównując poszczególne próbki włókien formowane przy tej samej wartości wyciągu filerowego, a przy zmiennym rozkładzie rozciągów zauważyć można, że optymalny rozkład rozciągów (próbki z symbolem R) pozwala na uzyskanie wyższych wartości rozciągu całkowitego. Podobną tendencję można zaobserwować badając wytrzymałość właściwą włókien. Stosowanie zoptymalizowanego rozkładu rozciągów skutkuje wyższą wartością wytrzymałości właściwej, niż w przypadku włókien formowanych z maksymalnym rozciąganiem. Wzrost wartości parametrów obserwowany jest także w przypadku Modułu Younga i wydłużenia przy zerwaniu (TABELA 1).

Jedynie w przypadku próbki PWR3 widzimy nieznaczny spadek tych wartości, znajdujący się w granicy błędów pomiarowych. Występowanie w tworzywie polimerowym porów, rys, oraz szczelin poprawia nieznacznie właściwości sorpcyjne, poprzez możliwość powierzchniowego przyłączenia cząsteczek wody siłami adhezji i na zasadzie zjawiska kondensacji kapilarnej. W zależności od wielkości porów możliwy jest wzrost parametru sorpcji bądź retencji. W przypadku stosowania optymalnego rozkładu rozciągów całkowita objętość porów do 1000 nm ulega zmniejszeniu w porównaniu do włókien formowanych przy rozkładzie rozciągów. Analizując sorpcję wilgoci w 65% RH wartości wahają się w zakresie od 1,21 do

was determined by referring the water mass which remained in the fibre after centrifugation to the mass of dry fibre.

## Results and discussions

To obtain improved strength of PAN fibres with the Ca<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub> nanoadditive, the coagulation process was conducted in mild conditions at a variable solvent content in the bath (range: 60-70% at 15-20°C). The coagulation was carried out according to the diffusion mechanism; therefore, a low-deformation structure was obtained. The assumed manufacturing conditions were as determined earlier [6, 7]. The coagulation process for respective polyacrylonitrile fibres was conducted so as to obtain maximum strength at elevated sorption properties.

Therefore, various as-spun draw ratios were used (-40% to +10%). It is noted when comparing respective fibre samples formed at the same as-spun draw ratio and with a variable stretch distribution that an optimum draw distribution (R-coded samples) yields higher total draw ratio values. A similar tendency is observed when testing fibre tenacity. When the optimised draw distribution is used, tenacity is higher than for fibres spun at the maximum draw distribution. Higher values were also seen for Young's modulus and elongation at break (TABLE 1).

Slightly reduced values, within the measurement error, are seen for the PWR3 sample only. Pores, scratches and fissures in the pore polymer material slightly improve sorption properties by the possibility of water molecule binding on the surface through adhesion forces and capillary

**TABELA 1. Warunki formowania i właściwości wytrzymałości włókien PAN otrzymanych z roztworu o 3% udziale Ca<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>.**  
**TABLE 1. Strength properties of PAN fibres obtained wet from solution with 3% of Ca<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>.**

Symbol próbki Sample Symbol	Wyciąg filerowy As-spun draw ratio [%]	Rozciąg całkowity Total draw ratio [%]	Wytrzymałość właściwa Tenacity [cN/tex]	Moduł Younga Young's modulus [Pa]	Wydłużenie przy zerwaniu Elongation at break [%]
PW1	-40	683,01	31,80±1,17	7,57±0,39	13,50±0,65
PWR1	-40	750,89	41,94±1,25	7,57±0,46	14,33±0,51
PW2	-30	661,52	30,37±1,11	7,89±0,48	14,32±1,79
PWR2	-30	680,47	31,19±0,92	8,08±0,46	13,44±0,56
PW3	-10	552,81	26,19±0,98	7,77±0,41	13,93±0,63
PWR3	-10	606,07	26,84±0,89	7,50±0,47	13,13±0,67
PW4	+10	520,11	20,42±1,18	6,95±0,47	11,74±0,60
PWR4	+10	523,64	23,77±0,91	7,66±0,47	11,96±1,07

Próbki z indeksem R oznaczają, iż proces rozciągania realizowany był przy rozkładzie rozciągów R<sub>1</sub>=0,7 max; R<sub>2</sub>=max  
Próbki bez indeksu R oznaczają, iż proces rozciągania realizowany był przy maksymalnym rozkładzie rozciągów.  
R-coded samples denote drawing processes carried out at a draw distribution of R<sub>1</sub>=0.7 max; R<sub>2</sub>=max.  
Non-R-coded samples denote drawing processes carried out at the maximum draw distribution.

condensation. Water sorption or retention parameters may increase depending on the pore size.

When the optimum draw distribution is used, the total pore volume up to 1000 nm is reduced compared to fibres spun at the maximum draw distribution. The analysis of water sorption at 65% RH proves that the values are between 1.21 and 1.83% (TABLE 2). However, for sorption at 100% RH, the values are between 6.3 and 9.59%. Water

1,83% (TABELA 2). Natomiast w przypadku sorpcji w 100% RH wartości zawierają się w przedziale od 6,3 do 9,59%. Właściwości sorpcyjne związane są z hydrofobowym charakterem tworzywa. Rozpatrując parametr retencji wody zmiana wartości jest niewielka i wynosi 7,44-13,83%. Najwyższe właściwości wytrzymałościowe uzyskuje się przy stosowaniu skrajnie ujemnego wyciągu filerowego (-40%) i wynosi ona 31,80 cN/tex. Wprowadzenie do tworzywa nanododatku nie wpłynęło na zmianę kształtu przekroju poprzecznego otrzymanych włókien. Odnaczają się one, typowym dla tego tworzywa charakterystycznym faskolkowym kształtem (RYSUNEK 1).

## Wnioski

1. Stosowanie zoptymalizowanego rozkładu rozciągów pozwala na uzyskanie wyższych wartości rozciągu całkowitego, tym samym skutkując wyższą podatnością na deformację formowanych włókien, co przekłada się na ich właściwości wytrzymałościowe.

2. Stosowanie dwuetapowego rozkładu rozciągów o rozciągu zoptymalizowanym, wynoszącym 0,7 max, pozwala na uzyskanie włókien o wyższych właściwościach wytrzymałościowych niż w przy analogicznie prowadzonym procesie przy maksymalnych wartościach rozciągu.

3. Włókna o najwyższej wytrzymałości właściwej rzędu 41,94 cN/tex uzyskuje się stosując skrajnie ujemną wartość wyciągu filerowego wynoszącą -40%.

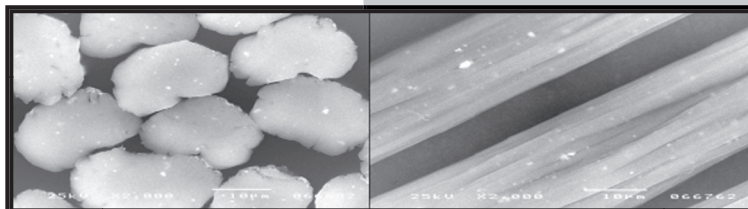
4. Uzyskane włókna odznaczają się niewielką porowatością oraz niskimi właściwościami sorpcyjnymi związanymi głównie z charakterem tworzywa.

## Podziękowania

Prace finansowane w ramach NCN (Narodowe Centrum Nauki) projektu N 508487636.

**TABELA 2. Udział procentowy por, wartości sorpcji, retencji włókien PAN zawierających nanododatek  $\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ .**  
**TABLE 2. The porous structure and sorption properties of PAN fibers containing  $\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  nanoparticles.**

Symbol próbki Sample Symbol	Całkowita objętość por Total volume of pores [cm <sup>3</sup> /g]	Objętość por do 100nm Volume of pores for pores radii 3-100nm [cm <sup>3</sup> /g]	Całkowita powierzchnia wewnętrzna Total internal surface of pores [m <sup>2</sup> /g]	Sorpcja wilgoci 65% RH Moisture sorption at 65% RH [%]	Sorpcja wilgoci 100% RH Moisture sorption at 100% RH [%]	Retencja wody Water retention [%]
PW1	0,2867470	0,10720	25,780	1,57	6,3	8,69
PWR1	0,1657895	0,08686	17,798	1,58	6,14	7,44
PW2	0,2758621	0,09653	23,521	1,69	7,61	9,05
PWR2	0,2630769	0,08618	19,774	1,31	6,97	7,24
PW3	0,9583333	0,19793	21,441	1,87	7,82	9,23
PWR3	0,2631579	0,06050	10,039	1,21	8,38	---
PW4	0,4523256	0,20435	26,974	1,4	7,83	13,83
PWR4	0,4609756	0,18051	23,545	1,83	9,59	---



**RYSUNEK.1. Zdjęcia z mikroskopu skaningowego, widok wzdłużny i przekrój poprzeczny.**  
**FIGURE.1. SEM images from Canning electron microscopy longitudinal view and cross-section.**

sorption values are related to the hydrophobic nature of the material. With the water retention parameter, the change in the value is minor: 7.44-13.83%. The highest tenacity of 31.80 cN/tex is achieved with an extremely negative as-spun draw ratio (-40%). The nanoadditive incorporated into the material did not lead to a changed cross section of the resulting fibres. They have a characteristic bean shape typical of the material (FIGURE 1).

## Conclusions

1. When optimised draw distribution was used, higher total draw ratio values were achieved, which led to higher susceptibility to deformation of the fibres spun and, therefore, improved tenacity.

2. With a two-stage draw distribution with an optimised draw of 0.7 max, fibres with higher tenacity were obtained than for a similar process at the maximum draw value.

3. Fibres with the highest tenacity of 41.94 cN/tex are obtained with the extremely negative as-spun draw ratio of -40%.

4. The fibres have low porosity and low water sorption properties related mainly to the nature of the material and the porous character of obtained fibres.

## Acknowledgements

The work is financed under NCN (National Centre of Science) project N508487636

## Piśmiennictwo

- [1] Noistering, J.F.: Carbon fibre composites as stay cables for bridges. Applied composites materials, 7, 2000, 139-150.
- [2] Patent polski PL 121830B2.
- [3] Bahl, O. P., Mathur, R. B., Kundra, K. D.: Fiber Sci. Technol. 15, 1981, 147.
- [4] Chari, S. S., Bahl, O. P., Mathur, R. B.: Fibre Sci. Technol. 15, 1981, 153.

## References

- [5] Mikołajczyk, T.; Boguń M.; Kowalczyk, A. Fibres&Textiles in Eastern Europe 2005, 3,30.
- [6] Boguń, M.; Mikołajczyk, T.; Kurzak, A.; Błazewicz, M.; Rajzer, I. Fibres&Textiles in Eastern Europe 2006,2, 13.
- [7] Mikołajczyk, T., Modyfikacje sposobu wytwarzania włókien poliakrylonitrylowych 1997,12-16.

## TESTY POTENCJODYNAMICZNE DRUTÓW STALOWYCH PRZEZNACZONYCH DLA KARDIOLOGII

JOANNA PRZONDZIO<sup>1</sup>, WITOLD WALKE<sup>2</sup>, MAŁGORZATA FILIPEK<sup>1</sup>,  
PIOTR WRONA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLITECHNIKA ŚLĄSKA, KATEDRA TECHNOLOGII MATERIAŁÓW,  
UL. KRASIŃSKIEGO 8, 40-019 KATOWICE, POLSKA

<sup>2</sup>POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH,  
UL. AKADEMICKA 16, 44-100 GLIWICE, POLSKA  
MAILTO:JOANNA.PRZONDZIO@POLSL.PL

### Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu modyfikacji powierzchni oraz odkształcenia zadawanego w procesie ciągnięcia na właściwości korozyjne drutów ze stali X2CrNiMo 17-12-2 przeznaczonych dla kardiologii inwazyjnej. Odporność na korozję elektrochemiczną oceniano w oparciu o rejestrację krzywych polaryzacji anodowej metodą potencjodynamiczną. Krótkotrwałe testy potencjodynamiczne, jak również testy po 30. dniowej ekspozycji realizowano w sztucznym osoczu symulującym środowisko układu krwionośnego. Kolejne etapy modyfikacji powierzchni polegały na szlifowaniu drutów po technologicznym procesie ciągnięcia, ich elektrochemicznym polerowaniu oraz chemicznej pasywacji. Testy potencjodynamiczne w roztworze sztucznego osocza wykazały zróżnicowaną odporność na korozję elektrochemiczną drutów ciągniętych z odkształceniem w zakresie  $\varepsilon=0\div2,99$ . Stwierdzono, że najwyższą odpornością korozyjną charakteryzuje się walcówka w stanie wyzarzonym. Wraz ze wzrostem odkształcenia następuje obniżenie charakterystyk korozyjnych drutu. Zaobserwowano, że z kolei zabiegi modyfikacji powierzchni poprawiają właściwości korozyjne drutów. Dodatkowe polepszenie odporności drutów na korozję elektrochemiczną spowodowała 30. dniowa ekspozycja w sztucznym osoczu.

**Słowa kluczowe:** druty ze stali nierdzewnej X2CrNiMo 17-12-2, korozja elektrochemiczna, testy potencjodynamiczne w sztucznym osoczu, modyfikacja powierzchni

[Inżynieria Biomateriałów, 117-118, (2012), 104-108]

### Wprowadzenie

Badania zjawisk korozyjnych zachodzących na instrumentarium i implantach przeznaczonych do kontaktu z krwią wykazały, że prawidłowa ich biotolerancja związana jest bezpośrednio z wysoką odpornością korozyjną materiałów metalowych. Właściwości drutu i wyrobów z drutu zależą głównie od jakości metalurgicznej stali użytej do ich produkcji, umocnienia odkształceniowego zachodzącego w procesach przeróbki plastycznej na zimno, struktury i właściwości użytkowych oraz właściwości fizykochemicznych powierzchni. Metody kształtowania prawidłowych właściwości fizykochemicznych powierzchni w istotny sposób ograniczają niekorzystne zjawiska zachodzące na granicy faz: biomateriał – środowisko tkankowe. Modyfikacja powierzchni powinna powodować minimalizację ilości produktów korozji przenikających do środowiska tkankowego

## POTENTIODYNAMIC TESTS OF STEEL WIRES FOR CARDIOLOGY

JOANNA PRZONDZIO<sup>1</sup>, WITOLD WALKE<sup>2</sup>, MAŁGORZATA FILIPEK<sup>1</sup>,  
PIOTR WRONA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND METALLURGY,  
8 KRASIŃSKIEGO STR., 40-019 KATOWICE, POLAND

<sup>2</sup>SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING,  
16 AKADEMICKA STR., 44-100 GLIWICE, POLAND  
MAILTO:JOANNA.PRZONDZIO@POLSL.PL

### Abstract

The study was aimed at evaluation of the impact of surface modification and strain applied in drawing process on corrosion characteristics of wires made of X2CrNiMo 17-12-2 steel used in invasive cardiology. Resistance to electrochemical corrosion was evaluated on the ground of anodic polarisation curves registered by means of potentiodynamic method. Short-term potentiodynamic tests as well as tests after 30-day exposure were performed in artificial blood plasma simulating blood vascular system. Further steps of surface modification comprised grinding wires that have been subject to technological drawing process, their electrochemical polishing and chemical passivation. Potentiodynamic tests in artificial blood plasma solution showed differentiated resistance to electrochemical corrosion of wires drawn with strain applied within the range of  $\varepsilon=0\div2,99$ . It was proved that annealed wire rod featured the highest corrosion resistance. With increasing strain, wire corrosion properties decrease. Next, it was observed that surface treatment increases wire corrosion characteristics. Additional improvement of wire resistance to electrochemical corrosion was brought forth by 30-day exposure to artificial blood plasma.

**Key words:** wires made of stainless steel X2CrNiMo 17-12-2, electrochemical corrosion, potentiodynamic tests in artificial blood plasma, surface modification

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 104-108]

### Introduction

Tests of corrosion phenomena that take place on instruments and implants intended to contact blood showed that their proper biotolerance is directly related to high corrosion resistance of metallic materials. Properties of wires and wire products mainly depend on metallurgical quality of steel used for their production, work hardening that takes place in the process of cold working, structure and functional characteristics as well as physical and chemical characteristics of the surface. Methods how to achieve proper physical and chemical surface characteristics limit to a great extent unfavourable phenomena that take place on phase boundary: biomaterial – tissue. Surface modification should minimize the amount of corrosion products penetrating to the tissue. Surface layer is shaped through application of various surface engineering technologies, among other things: electrochemical polishing and passivation.

Steel X2CrNiMo 17-12-2, popular in cardiology, is used among other things for production of guide wires and stents [1-4]. The study presents analysis of surface modification



Warstwa powierzchniowa kształtowana jest poprzez zastosowanie różnych technologii inżynierii powierzchni, m. in. elektrochemicznego polerowania oraz pasywacji.

W kardiologii zastosowanie znajduje stal X2CrNiMo 17-12-2 stosowana m. in. do wytwarzania drutów prowadzących i stentów [1-4]. W pracy dokonano analizy wpływu modyfikacji powierzchni oraz odkształcenia zadawanego w procesie przeróbki plastycznej na właściwości korozyjne drutów ze stali X2CrNiMo 17-12-2 przeznaczonych dla kardiologii inwazyjnej. Testy potencjodynamiczne realizowano w sztucznym osoczu symulującym środowisko układu krwionośnego.

## Material i metodyka

Materiałem wyjściowym do badań była walcówka wykonana ze stali X2CrNiMo 17-12-2 średnicy 5,58 mm w stanie wyzarzonym. Walcówkę ciągniono do średnicy 1,25 mm. W trakcie realizacji procesu ciągnięcia odcinano próbki drutu do badań korozyjnych. Druty poddano następnie zabiegom modyfikacji powierzchni, które polegały na szlifowaniu, elektrochemicznym polerowaniu oraz chemicznej pasywacji.

Odporność na korozję elektrochemiczną oceniano w oparciu o rejestrację krzywych polaryzacji anodowej metodą potencjodynamiczną z wykorzystaniem systemu do badań elektrochemicznych VoltaLab® PGP 201 firmy Radiometer [5-8]. Wykonano krótkotrwałe testy korozyjne oraz badania po 30. dniowej ekspozycji drutów w roztworze sztucznego osocza. Skład chemiczny osocza podano w TABLICY 1. Badania realizowano zgodnie z zaleceniami normy EN-ISO 17475:2008. Podstawę do wyznaczenia charakterystycznych wielkości opisujących odporność na korozję wżerową stanowiły krzywe polaryzacji anodowej.

Przed przystąpieniem do badań wszystkie próbki oczyszczono w 96 % alkoholu etylowym w płuczce ultradźwiękowej. Badania rozpoczynano od wyznaczenia potencjału korozyjnego, a następnie zarejestrowano krzywe polaryzacji anodowej. Na podstawie zarejestrowanych krzywych wyznaczono charakterystyczne wielkości opisujące odporność na korozję wżerową, tj.: potencjał przebicia, opór polaryzacyjny, gęstość prądu korozyjnego. Badania realizowano osobno dla próbek szlifowanych, osobno dla szlifowanych, a następnie polepowanych oraz próbek szlifowanych, polepowanych i chemicznie pasywowanych. Dla wyznaczenia oporu polaryzacji zastosowano metodę Sterna.

Testy potencjodynamiczne realizowano w temperaturze  $T=37\pm1^{\circ}\text{C}$ , a  $\text{pH}=7,0\pm0,2$ . Elektroda odniesienia była nasycona elektroda kalomelowa (NEK) typu KP-113, natomiast elektrodą pomocniczą - elektrodą platynową typu PtP-201. Badania rozpoczynano od wyznaczenia potencjału otwarcia  $E_{\text{OCP}}$ . W dalszej kolejności rejestrowano krzywe polaryzacji anodowej, rozpoczynając pomiary od potencjału o wartości  $E=E_{\text{OCP}}-100\text{ mV}$ . Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością  $1\text{ mV/s}$ . Po osiągnięciu gęstości prądu anodowego  $10\text{ mA/cm}^2$  zmieniano kierunek polaryzacji. W ten sposób rejestrowano krzywą powrotną. Potencjał otwarcia  $E_{\text{OCP}}$  badanych próbek ustalał się po 60 minutach.

## Wyniki i dyskusja

Zrealizowane badania potencjodynamiczne w sztucznym osoczu pozwoliły na ustalenie, jak zmienia się odporność na korozję elektrochemiczną drutów zarówno w zależności od

influence and strain applied in plastic working on corrosion characteristics of wires made of X2CrNiMo 17-12-2 steel for invasive cardiology. Potentiodynamic tests were performed in artificial blood plasma simulating blood and vascular system environment.

## Material and methodology

Annealed wire rod of X2CrNiMo 17-12-2 steel with diameter of 5,58 mm was used as stock material for tests. Wire rod was drawn to the diameter of 1,25 mm. During drawing process wire samples were cut off for corrosion tests. Next, wire was subject to surface modification, which included grinding, electrochemical polishing and chemical passivation.

Resistance to electrochemical corrosion was evaluated on the ground of anodic polarisation curves registered with potentiodynamic method with application of electrochemical testing system VoltaLab® PGP 201 by Radiometer [5-8]. Short-term corrosion tests as well as tests after 30-day wire exposure to artificial blood plasma solution were performed. Chemical composition of the solution is presented in TABLE 1. The tests were performed in accordance with recommendations of EN-ISO 17475:2008. Anodic polarisation curves enabled to determine typical factors describing resistance to pitting corrosion.

Prior to test commencement, all samples were cleaned in 96 % ethanol in ultrasonic washer. The tests started with determination of corrosion potential, which was followed by registration of anodic polarisation curves. Registered curves enabled to determine the following typical factors

**TABLICA 1. Skład chemiczny roztworu sztucznego osocza.**  
**TABLE 1. Chemical composition of artificial blood plasma solution.**

Związek chemiczny Chemical compound	Ilość wody destylowanej, g/l Amount of distilled water, g/l
NaCl	6,8
CaCl <sub>2</sub>	0,2
KCl	0,4
MgSO <sub>4</sub>	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	2,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,126
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,026

describing resistance to pitting corrosion: breakdown potential, polarisation resistance, corrosion current density. The tests were performed separately for ground samples, for ground and then polished samples and finally for samples that were ground, polished and chemically passivated. Stern method was used to determine polarisation resistance.

Potentiodynamic tests were performed at the temperature of  $T=37\pm1^{\circ}\text{C}$ , and  $\text{pH}=7,0\pm0,2$ . Saturated calomel electrode (NEK) of KP-113 type served as the reference electrode, whereas platinum electrode of PtP-201 type served as auxiliary electrode. The tests started with determination of opening potential  $E_{\text{OCP}}$ . Next, anodic polarisation curves were registered, the measurement starting with potential  $E=E_{\text{OCP}}-100\text{ mV}$ . Potential changed in anodic direction at the rate  $1\text{ mV/s}$ . When anodic current density reached  $10\text{ mA/cm}^2$ , polarisation direction was reversed. Thus, return curve was registered. Opening potential  $E_{\text{OCP}}$  of tested samples stabilised after 60 minutes.

## Results and review

Performed potentiodynamic tests in artificial blood plasma enabled to determine changes to wire resistance to electrochemical corrosion, depending both on strain ap-

**TABLICA 2. Wyniki krótkotrwałych testów korozyjnych**  
**TABLE 2. Results of short-term corrosion tests**

Średnica drutu d, mm Wire diameter d, mm	Stan powierzchni drutu Condition of wire surface	Odształcenie w procesie ciągnienia, $\varepsilon$ Strain applied in drawing process, $\varepsilon$	Potencjał korozyjny $E_{kor}$ , mV Corrosion potential $E_{corr}$ , mV	Opór polaryzacyjny $R_p$ , $k\Omega cm^2$ Polarisation resistance $R_p$ , $k\Omega cm^2$	Gęstość prądu korozyjnego $i_{kor}$ , $\mu A/cm^2$ Corrosion current density $i_{corr}$ , $\mu A/cm^2$	Potencjał przebiecia $E_b$ , mV Breakdown potential $E_b$ , mV
5,58	szlifowany	0	-179	791	0,033	+490
	polerowany		-28	341	0,076	+371
	pasywowany		-19	1030	0,025	+1159
2,12	szlifowany	1,94	-193	406	0,064	+408
	polerowany		-82	230	0,113	+344
	pasywowany		-61	2350	0,011	+940
1,25	szlifowany	2,99	-224	145	0,179	+380
	polerowany		-122	126	0,206	+126
	pasywowany		-40	779	0,033	+639

odkształcenia zadawanego w procesie ciągnienia, jak i od sposobu przygotowania powierzchni drutu.

W TABLICY 2 przedstawiono wyniki krótkotrwałych testów potencjodynamicznych, a w TABLICY 3 wyniki badań korozyjnych drutów wybranych średnic po 30. dniowej ekspozycji w roztworze sztucznego osocza.

plied in drawing process as well as the way of wire surface preparation.

TABLE 2 presents the results of short-term potentiodynamic tests, and TABLE 3 shows the results of corrosion tests of wires with specified diameter after 30-day exposure to artificial blood plasma solution.

**TABLICA 3. Wyniki testów korozyjnych po 30. dniowej ekspozycji w sztucznych osoczu**  
**TABLE 3. Results of corrosion tests after 30-day exposure to artificial blood plasma**

Średnica drutu d, mm Wire diameter d, mm	Stan powierzchni drutu Condition of wire surface	Odształcenie w procesie ciągnienia, $\varepsilon$ Strain applied in drawing process, $\varepsilon$	Potencjał korozyjny $E_{kor}$ , mV Corrosion potential $E_{corr}$ , mV	Opór polaryzacyjny $R_p$ , $k\Omega cm^2$ Polarisation resistance $R_p$ , $k\Omega cm^2$	Gęstość prądu korozyjnego $i_{kor}$ , $\mu A/cm^2$ Corrosion current density $i_{corr}$ , $\mu A/cm^2$	Potencjał przebiecia $E_b$ , mV Breakdown potential $E_b$ , mV
5,58	szlifowany	0	-129	135	0,193	+440
	polerowany		-274	80	0,325	+776
	pasywowany		+120	337	0,077	+1198
2,75	szlifowany	1,39	-116	398	0,065	+377
	polerowany		-231	181	0,144	+612
	pasywowany		-224	421	0,062	+1077
1,25	szlifowany	2,99	-195	430	0,060	+470
	polerowany		-127	1050	0,025	+561
	pasywowany		-176	964	0,027	+1161

Na RYS.1 przedstawiono krzywe polaryzacji anodowej drutów średnicy 5,58 i 1,25 mm po krótkotrwałych testach korozyjnych. RYS.2 ilustruje krzywe polaryzacji anodowej drutów tych samych średnic po 30. dniowej ekspozycji w roztworze sztucznego osocza.

Testy potencjodynamiczne w roztworze sztucznego osocza wykazały różnicowaną odporność na korozję elektrochemiczną drutów ciągniętych z odkształceniem w zakresie  $\varepsilon=0\div2,99$ . Stwierdzono, że najwyższą odpornością korozyjną charakteryzuje się walcówka w stanie wyżarzonym. Wraz ze wzrostem odkształcenia następuje obniżenie charakterystyk korozyjnych drutu.

Przykładowo, w krótkotrwałych badaniach korozyjnych potencjał korozyjny walcówki szlifowanej wynosi  $E_{kor}=-179$  mV, a drutu szlifowanego średnicy 1,25 mm -  $E_{kor}=-224$  mV. Opór polaryzacji tych dwóch materiałów obniża się z  $R_p=791$   $k\Omega cm^2$  (walcówka) do  $R_p=145$   $k\Omega cm^2$  (drut średnicy 1,25 mm). Potencjał przebiecia spada z warto-

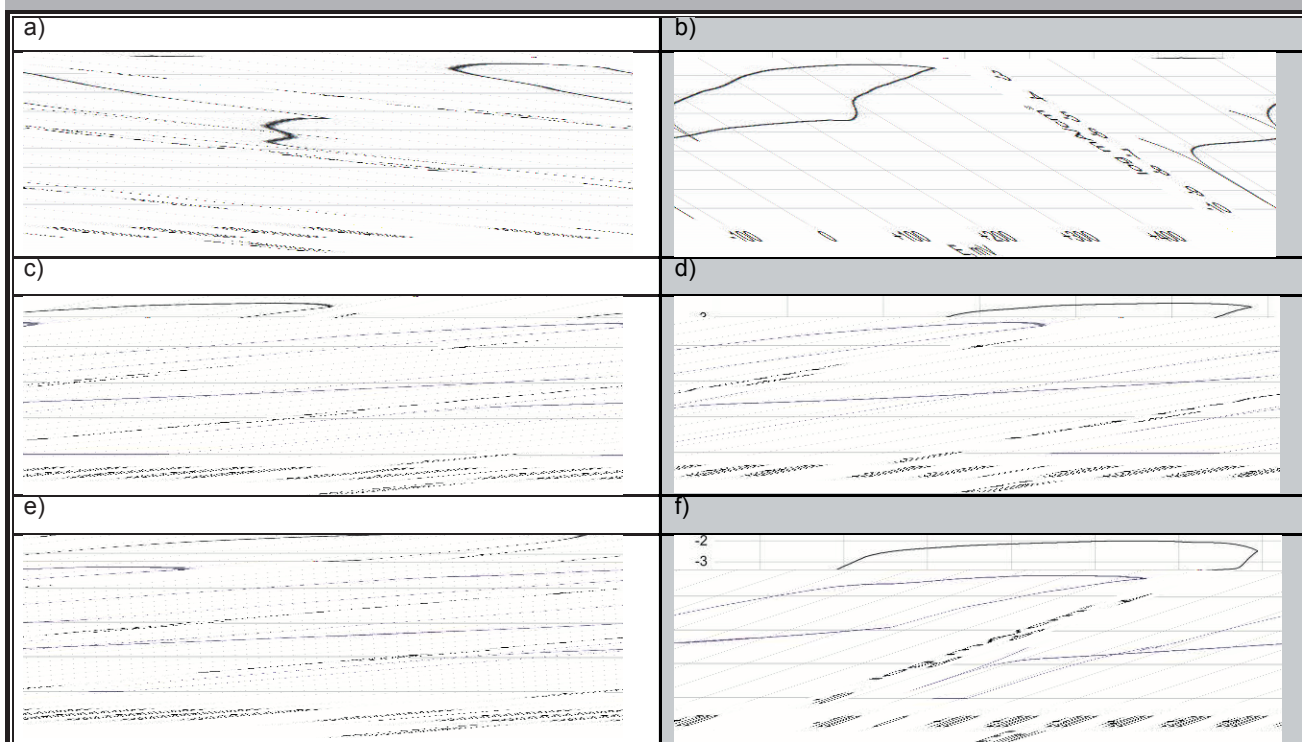
FIG.1 presents anodic polarisation curves of wires with diameter of 5,58 and 1,25 mm after short-term corrosion tests. FIG.2 presents anodic polarisation curves of wires with the same diameter after 30-day exposure to artificial blood plasma solution.

Potentiodynamic tests in artificial blood plasma solution showed differentiated resistance to electrochemical corrosion of wires drawn with strain in the range of  $\varepsilon=0\div2,99$ . It was proved that annealed wire rod featured the best corrosion resistance. With increasing strain, wire corrosion properties decrease.

For example, in short-term corrosion tests, corrosion potential of wire rod equals  $E_{corr}=-179$  mV, and of ground wire with diameter of 1,25 mm -  $E_{corr}=-224$  mV. Polarisation resistance of those two materials decreases from  $R_p=791$   $k\Omega cm^2$  (wire rod) to  $R_p=145$   $k\Omega cm^2$  (wire with diameter of 1,25 mm). Perforation potential decreases from  $E_b=+440$  mV (wire rod) to  $E_b=+380$  mV (wire with diameter of 1,25 mm).

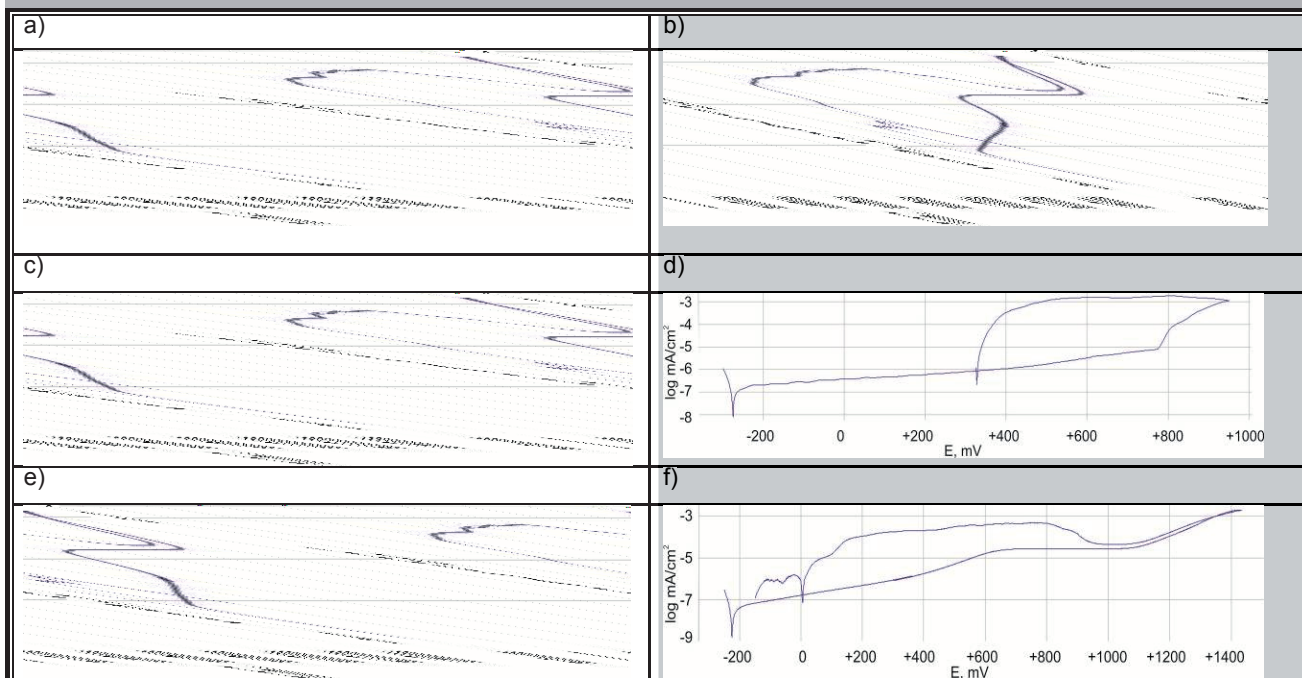
**RYS. 1.** Krzywe polaryzacji anodowej wyznaczone dla drutów: a) szlifowanych -  $d = 1,25$  mm, b) szlifowanych -  $d = 5,58$  mm, c) polerowanych -  $d = 1,25$  mm, d) polerowanych -  $d = 5,58$  mm, e) pasywowanych -  $d = 1,25$  mm, f) pasywowanych -  $d = 5,58$  mm.

**FIG. 1.** Anodic polarisation curves determined for wires: a) ground -  $d = 1,25$  mm, b) ground -  $d = 5,58$  mm, c) polished -  $d = 1,25$  mm, d) polished -  $d = 5,58$  mm, e) passivated -  $d = 1,25$  mm, f) passivated -  $d = 5,58$  mm.



**RYS. 2.** Krzywe polaryzacji anodowej po 30. dniowej ekspozycji w sztucznym osoczu wyznaczone dla drutów: a) szlifowanych -  $d = 1,25$  mm, b) szlifowanych -  $d = 5,58$  mm, c) polerowanych -  $d = 1,25$  mm, d) polerowanych -  $d = 5,58$  mm, e) pasywowanych -  $d = 1,25$  mm, f) pasywowanych -  $d = 5,58$  mm.

**FIG. 2.** Anodic polarisation curves after 30-day exposure to artificial blood plasma, determined for the following wires: a) ground -  $d = 1,25$  mm, b) ground -  $d = 5,58$  mm, c) polished -  $d = 1,25$  mm, d) polished -  $d = 5,58$  mm, e) passivated -  $d = 1,25$  mm, f) passivated -  $d = 5,58$  mm.



ści  $E_p = +440$  mV (walcówka) do  $E_p = +380$  mV (drut średnicy 1,25 mm).

Zrealizowane badania wykazały, że modyfikacja powierzchni drutów znacząco poprawiła ich charakterystyki korozyjne. W krótkotrwałych testach potencjodynamicz-

Performed tests proved that wire surface modification improved significantly its corrosion characteristics. In short-term potentiodynamic tests, corrosion potential of wire rod increases from  $E_{corr} = -179$  mV (ground wire rod) to  $E_{corr} = -28$  mV (wire rod after grinding and electrochemical polishing),



nych potencjał korozyjny walcówki wzrasta z  $E_{kor} = -179$  mV (walcówka szlifowana) do  $E_{kor} = -28$  mV (walcówka szlifowana i elektrochemicznie polerowana), a następnie do  $E_{kor} = -19$  mV (walcówka szlifowana, polerowana i chemicznie pasywowana). Opór polaryzacji walcówki po kolejnych etapach obróbki powierzchniowej rośnie z  $R_p = 791$  k $\Omega$ cm<sup>2</sup> (walcówka szlifowana) do  $R_p = 1030$  k $\Omega$ cm<sup>2</sup> (walcówka szlifowana, polerowana i chemicznie pasywowana). Potencjał przebicia wzrasta z wartości  $E_b = +440$  mV (walcówka szlifowana) do  $E_b = +1159$  mV (walcówka szlifowana, polerowana i chemicznie pasywowana).

Testy potencjodynamiczne zrealizowane po 30. dniowej ekspozycji w roztworze sztucznego osocza wykazały, że w większości przypadków właściwości korozyjne drutów uległy poprawie. Najlepiej można to zobrazować na przykładzie potencjału przebicia, którego wartość jest znacząco wyższa od wartości uzyskanych w krótkotrwałych testach korozyjnych. Należy przypuszczać, że ekspozycja w sztucznym osoczu spowodowała dodatkowo wytworzenie cienkiej warstwy tlenkowej o większej stabilności w stosunku do warstwy powstałej w wyniku procesów modyfikacji powierzchni. Zjawisko to jest korzystne i pożądane, zwłaszcza w przypadku zastosowania w zabiegach kardiologii inwazyjnej implantów - stentów.

## Podsumowanie

Krótko- i długotrwałe testy potencjodynamiczne drutów wykonanych ze stali nierdzewnej X2CrNiMo 17-12-2 pozwoliły na ustalenie ich odporności na korozję elektrochemiczną w środowisku sztucznego osocza. Analiza porównawcza wszystkich polaryzacji anodowej wykazała, że na powierzchni wszystkich badanych drutów wystąpiła korozja wżerowa.

Stwierdzono, że odkształcenie zadawane w procesie ciągnięcia powoduje obniżenie właściwości korozyjnych drutów. Wraz ze wzrostem odkształcenia maleje potencjał korozyjny, potencjał przebicia oraz opór polaryzacji. Zwiększeniu ulega gęstość prądu korozyjnego. Badania wykazały również korzystny wpływ na odporność na korozję elektrochemiczną kolejno realizowanych zabiegów modyfikacji powierzchni.

Długotrwała ekspozycja w roztworze sztucznego osocza symulującym środowisko układu krwionośnego poprawiła odporność korozyjną drutów. Można wnioskować, że dodatkowa warstwa tlenkowa będzie powodować poprawę trwałości zastosowanych u pacjentów stentów kardiologicznych.

## Podziękowania

*Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki.*

## Piśmiennictwo

- [1] Marciniak J., Paszenda Z., Walke W., Kaczmarek M., Tyrlik-Held J., Kajzer W.: Stenty w chirurgii małoinwazyjnej. Wyd. Politechniki Śl., Gliwice, 2006.
- [2] Brzezińska-Rajszys G., Dąbrowski M., Różyło W., Witkowski A.: Kardiologia interwencyjna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
- [3] Kardiologia interwencyjna. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2009.
- [4] Marciniak J.: Biomateriały. Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.

and then to  $E_{corr} = -19$  mV (wire rod after grinding, polishing and chemical passivation). Polarisation resistance of wire rod after successive stages of surface treatment increases from  $R_p = 791$  k $\Omega$ cm<sup>2</sup> (ground wire rod) to  $R_p = 1030$  k $\Omega$ cm<sup>2</sup> (wire rod after grinding, polishing and chemical passivation). Perforation potential increases from  $E_b = +440$  mV (ground wire rod) to  $E_b = +1159$  mV (wire rod after grinding, polishing and chemical passivation).

Potentiodynamic tests performed after 30-day exposure to artificial blood plasma solution showed that in most cases wire corrosion characteristics improved. It can be best exemplified by perforation potential, the value of which is substantially higher than the values obtained after short-term corrosion tests. It can be assumed that exposure to artificial blood plasma caused in addition creation of a thin oxide layer with higher stability when compared to the layer created as the result of surface modification processes. This phenomenon is favourable and welcome, especially as far as application in invasive cardiology treatment – implants and stents – is concerned.

## Summary

Short- and long-term potentiodynamic tests of wires made of stainless steel X2CrNiMo 17-12-2 enabled to determine their resistance to electrochemical corrosion in artificial blood plasma. Comparative analysis of anodic polarisation curves showed presence of pitting corrosion on the surface of all tested wires.

It was proved that strain applied in drawing process brings forth decrease of wire corrosion properties. Along with increase in strain, corrosion potential, breakdown potential and polarisation resistance decrease. Corrosion current density increases. The tests also showed favourable influence of successively performed surface treatment on electrochemical corrosion.

Long-term exposure to artificial blood plasma simulating blood and vascular system improved wire resistance to corrosion. It can be concluded that an extra layer of oxides will improve durability of cardiology stents applied for patients.

## Acknowledgements

*This project was financed from the funds of the National Science Centre.*

## References

- [5] Kajzer W., Krauze A., Walke W., Marciniak J., Corrosion resistance of Cr-Ni-Mo steel in simulated body fluids, J. Achiev. Mater. Manuf. Eng. 1/2 (2006) 115-118.
- [6] Przondziona J., Walke W., Kulak K.: Potentiodynamic research of wires made of stainless steels in the environment of body fluids. Eng. Biomater., 11 (2008) 104-106.
- [7] Przondziona J., Walke W., Dańczak G.: Odporność na korozję elektrochemiczną drutów przeznaczonych na przewodniki kardiologiczne. Hutnik - Wiadomości Hutnicze, 78 (2011) 104-106.
- [8] Przondziona J., Walke W.: Potentiodynamic studies of stainless steel wire for endourology. Archives of Materials Science and Engineering, 35 (2009) 21-28.

# INFLUENCE ON THE TYPE OF MATERIALS OF THE FRICTION PAIR ON THE WEAR MECHANISM OF SPINAL INTERVERTEBRAL DISK IMPLANTS

MONIKA GIERZYŃSKA-DOLNA, MARCIN LIJEWSKI,  
JUSTYNA WENDLAND

METAL FORMING INSTITUTE  
14 JANA PAWŁA II STR., 61 – 139 POZNAŃ, POLAND

## Summary

*The paper discusses the purpose of a spinal disc implant. Indicated a significant effect on the material pair of friction on the frictional resistance. Tribological test results of spinal disc implants performed on the simulator. Discussed the mechanism of wear of the implants. Drew attention to the destructive role of wear products.*

**Keywords:** spine, spinal disc implants, testing friction - wear.

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 109-111]

## Introduction

We live in times, where the human body is exposed to the effects of harmful substances present in the ground, water, air, and food. We work at unergonomic work stations and lead unhealthy life styles. Sometimes, we practice sports, which cause overloading of the osteo-articular system. Every year, there is an increase in the amount of people suffering from spinal pain and of those experiencing mechanical spinal damage.

The most often occurring affections of the spine are pain syndromes of the L4-L5 segment, most often caused by spinal overloading, leading to so-called discopathy. Treatment of spinal affections is dependent on the level of advancement of the affection and may be realized using invasive or non-invasive methods.

One modern, invasive method of treating spinal affections such as discopathy, is the implantation of "artificial disks".

The main goal of surgical treatment of spinal damage is:

- Freeing nervous system structures from loads
- Reconstructing damaged vertebrae and ensuring correct spinal mobility
- Reconstruction of the spinal axis
- Ensuring fast rehabilitation of the patient

There are many types of spinal intervertebral disk implants that have been developed around the world, and they mostly differ in:

- Design
- Type of materials used
- Method of fastening between vertebrae

Examples of various design solutions of intervertebral disk implants have been discussed in works [1-5], among other sources.

The type of materials applied for the implant friction pair has a significant influence on:

- Friction resistance (friction coefficient)
- Intensity of wear
- Implant life
- Type and amount of formed wear products.

## Influence of material type on implant tribological properties

109  
.....

3-part implants are among the most often applied design solutions and consist of:

- Upper and lower metal rings
- A polyethylene nucleus pulposus

Thus, this is a friction pair of the type: "metal – polyethylene – metal". Metal elements of these implants are most often made from the CoCrMo alloy or the Ti6Al4V titanium alloy. The low friction element (nucleus pulposus) is made from ultra high molecular weight polyethylene.

Certain companies currently offer 2-part implants made from CoCrMo alloy without a polyethylene insert. This is a friction pair of the "metal – metal" type. In this solution, there is a properly shaped lower element cooperating with a concave element of the upper ring.

FIG.1 shows exemplary design solutions for a Charite III 3 – part implant with a polyethylene nucleus pulposus. Fig. 2 shows a "metal - metal" type 2-part implant from the Mampany.

Complete spinal implant tests are being conducted at the Biomedical Engineering Laboratory at the Metal Forming Institute in Poznan. Special simulators have been designed and made for these tests.

The influence of loading force and the type of materials used for the friction pair on friction resistance is illustrated by figures 3 and 4. As it results from the conducted tests,



FIG. 1. Exemplary design solutions of the 3-part implant (Charite III).

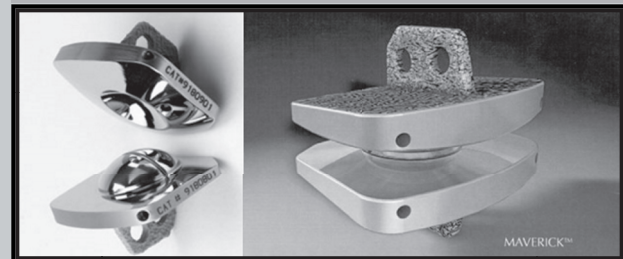


FIG. 2. Example of a "metal - metal" type 2-part implant.

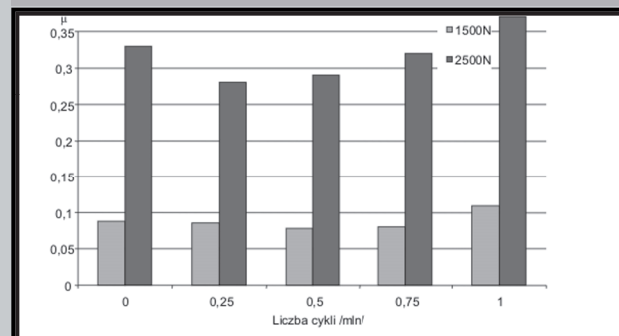
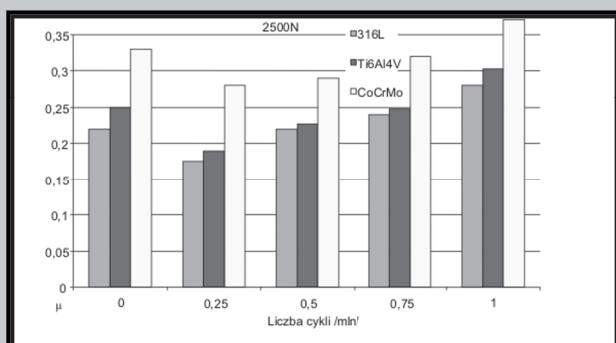


FIG. 3. Influence of loading force on the friction coefficient for a CoCrMo metal ring cooperating with a polyethylene insert.



**FIG. 4.** Influence of the number of work cycles on the friction coefficient for various friction pair materials  $P=2500$  N.

an increase in compressive force from 1500N to 2500N causes a 2,5-fold increase in the friction coefficient. Figure 4 presents friction coefficient value as a function of the number of cycles for various metal ring materials cooperating with the polyethylene insert.

As the number of work cycles increases, the friction coefficient value increases slightly. The highest value of  $\mu$  occurs for the CoCrMo – UHMWPE friction pair. The CoCrMo alloy has the greatest hardness.

Studies of 2-part implants comprised of an upper and lower ring made from CoCrMo alloy ("metal – metal" type friction pair) showed that the friction process is not very stable. After a relatively short work time, the implant is subject to wear.

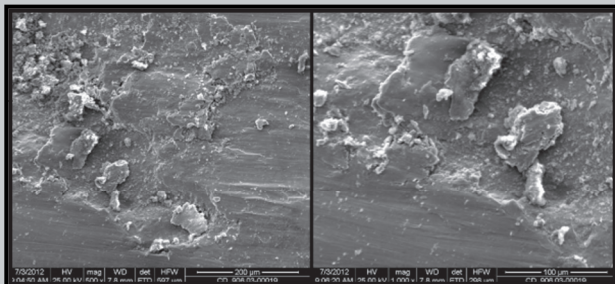
### Mechanism of spinal intervertebral disk implant wear

As the number of work cycles increases, the friction coefficient value also increases, and this is accompanied by an increase in the roughness of the surface of cooperating elements. Another disadvantageous symptom of the wear process is the formation of wear products, which are ejected from the friction zone after a certain time.

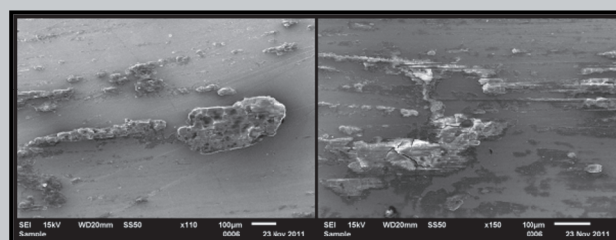
In artificial disk implants, depending on the applied materials, the following types of wear products may be present:

- Polyethylene particles with a size from 1 to 20  $\mu\text{m}$
- Metal particles
- Bone cement particles (when the implant is fastened using cement)

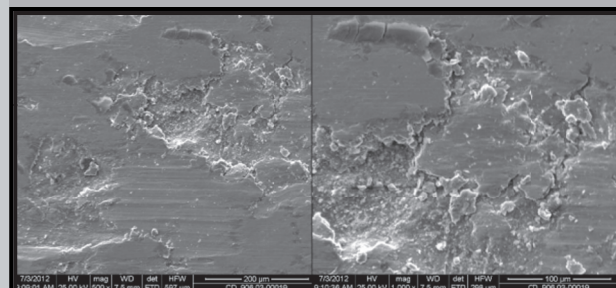
FIGURES 5 and 6 show the topography of the surface of a metal element with visible adhesion of polyethylene particles. The volume of adhesions increases along with the number of work cycles. After a certain time, the adherent polyethylene particles crack and chip off. Chipped off polyethylene particles are then ejected from the friction zone. In the case of a "metal-metal" type friction pair, wear



**FIG. 5.** Metal implant surface topography.



**FIG. 6.** Visible adhesions on the lower ring cooperating with a UHMWPE insert.



**FIG. 7.** View of adhesive wear of a metal-metal endoprosthesis.

products are mainly metal particles with dimensions of several microns. The topography of the surface of a metal implant with visible traces of adhesive wear is illustrated by FIGURES 7.

The mechanism of formation of wear products can be presented as follows:

Friction pair type: "metal – polyethylene".

Adhesion of polyethylene to the metal element (ring) → increase in adhesion volume → cracking and chipping off of adherent polyethylene particles → ejection from the friction zone → migration

Friction pair type: "metal – metal".

Wear (formation of adhesive connections) → successive destruction of adhesive connections as the number of work cycles increases → chipping off of metal particles → secondary influence of wear products (scratching and furrowing) → migration

Wear products may have a particularly disadvantageous influence on the human body. Wear products can accumulate in the area around the implant or migrate to the liver, spleen, or other organs. Therefore, wear products must be limited to a minimum.

### Conclusions

1. Friction and wear tests conducted on simulators give much valuable information on wear mechanisms and friction resistance as well as on the resistance to wear of cooperating materials of the friction pair.

2. Friction and wear processes occurring in the friction node, especially the amount and type of formed wear products, are decisive of the life of the implant.

3. Further advances in using implants with friction pairs is dependent on advances in the scope of selection of optimal materials for friction elements.

4. At the present level of knowledge, the "metal – polyethylene" friction pair can be acknowledged as optimal, however it is necessary to conduct work with the goal of increasing the resistance to wear of this material.

5. Using "metal – metal" friction pairs in implants requires studies on the selection and application of anti-adhesive coats.



## Acknowledgements

*This work is realized within the framework of research project No. 4795/B/T02/2009/37 financed by MNiSW.*

## References

- [1] Bono Ch., Garlin S., History and evaluation of disc replacement. The Spine Journal 4 (2004) 145-150.
- [2] Lee C., Longrana N., A review of spinal fusion for degenerative disc disease: need for alternation treatment approach of disc arthroplasty, The Spin Journal 4(2004) 173-176.
- [3] Lee C., Goel V., Artificial disc prosthesis – design concepts and criteria. The Spin Journal 4(2004) 209-218.
- [4] Dictrich M., Borkowski P., i inni Badanie istniejących i nowych konstrukcji implantów krążka międzykręgowego. Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, Warszawa 2004, 1045-1062.
- [5] Skalski K., Skoworodko J., Gierzyńska – Dolna M., Stabilizatory oraz implanty krążka międzykręgowego kręgosłupa – przegląd konstrukcji, Obróbka Plastyczna 4(2011) str. 303-317.
- [6] Skalski K. Magda J., Wiśniewski T., Skoworodko J., Gierzyńska – Dolna M., Symulator do badań tribologicznych implantów krążka międzykręgowego kręgosłupa 18th International Science nad Technicas Conference, Poznań, Wąsowo 2011.
- [7] Gierzyńska – Dolna M., Biotribologia, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa, 2002 r.

# POLY(E-CAPROLACTONE) AS POTENTIAL MATERIAL FOR CATHETERS TO XENOGENEIC TRANSPLANTATIONS AND EMBRYOLOGIC DEVICES

111  
.....

E. STODOLAK-ZYCH<sup>1</sup>, J. WIECZOREK<sup>2</sup>, U. PARA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup>NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF ANIMAL PRODUCTION,  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY OF ANIMAL REPRODUCTION,  
BALICE, POLAND

<sup>3</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
MULTIDISCIPLINARY SCHOOL OF ENGINEERING IN BIOMEDICINE,  
KRAKOW, POLAND

## Abstract

*The paper presents study performed to investigate the possible use of modified poly(ε-caprolactone) as a potential material for catheters. Experiment verifies if thermal modification using liquid nitrogen (LN) changes microstructure, biostability, mechanical and physicochemical properties of polymer. The easiness of forming material into tubes to confirm handiness was checked.*

**[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 111-114]**

## Introduction

Catheter is a flexible tube made of polymer or rubber, which can be inserted into the body cavity to create a canal for removing and delivering fluids or to set medical devices [1-2]. The most common types include urinary and intravenous catheters, and also those used for cardiac catheterization [3]. In the new applications, those devices can help acquiring tissue cells or conceptus during in vitro methods. Nowadays, there are many specialist designs of catheters which can be inserted into lungs, heart's arteries, urinary and central nervous system (CNS). Some can be used as optic, thermal or other diagnostic device or tools for medical treatment. Moreover, there are special kinds which are adapted for neonates and for removing tissues [4-5].

Vascular catheters are applied in angiography, angioplasty, balloon atrial septostomy and catheter-induced ablation. The construction of vascular catheter allows easy access to the patient's bloodstream for multiple vessel's enema, monitoring and keeping heart functions and periodic blood draws without additional injuring patient's tissues. Venous catheters enable also delivering medications or nutrients through the large vein directly into the circulatory system [6]. Unfortunately, there is a risk associated with using vascular catheters. They can become infected or blocked. Those problems remain unsolved despite many strategies like using antibacterial drugs or changing surface properties of polymers [7-8].

This study was performed to investigate the possible use of modified poly(ε-caprolactone) as a potential material for catheters. Experiment verifies if thermal modification; PCL freezing in liquid nitrogen (LN) and changes microstructure after process. Polymer materials were tested in biostability, mechanical and physicochemical properties of polymer surface. Biocompatibility of polymer after physical modifica-

tion (freezing in LN) were confirmed. The last step of the study was checking easiness of forming material into tubes to confirm handiness. The study was performed to extend application area of catheters to xenogeneic transplantations and embryologic devices (drawing and storing cells and conceptus).

## Materials and methods

Materials were prepared using synthetic poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL produced by Sigma Aldrich (Germany) with molecular weight of 60kDa and density of 1.145g/cm<sup>3</sup>. Dichloromethane (DCM, POCh, Gliwice, Poland) was used as a solvent for the polymer. PCL was dissolved in dichloromethane solution (the ratio of PCL:DCM was 1:20) during 24h. Films were obtained using the casting method. PCL films (samples), which were 150 $\mu$ m thick, were divided into two groups. First group was modified by putting in liquid nitrogen for 5min (named as PCL\_LN) and the second was control sample (named as PCL\_C). Profilometric examination, fluorescence microscopy and atomic force microscopy were used to examine surface modification.

Roughness of the material surface was investigated using profilometer Hommelwerke 500 and three different parameters were measured:  $R_a$ -arithmetic average of absolute values,  $R_t$ -maximum height of the profile between the highest peak and the lowest valley and  $R_z$ -average distance based on the five highest peaks and lowest valleys over the entire sampling length.

Surface microstructure were observed using fluorescence microscope HXP 120C. Surface topography was examined by atomic force microscope AFM Explorer (Veeco, USA). Works were conducted using contact mode by scanning upper surface of both types of samples (modified PCL\_LN and unmodified PCL\_C), on the area of 20x20 $\mu$ m (scanning speed 301,65 $\mu$ m/s with the resolution of 300 dpi). Measurements were conducted in three different areas and three different parameters were received as the result:  $R_a$  - arithmetic average of absolute values of entire profile, RMS - root mean square of roughness profile, AvgH - arithmetic average of roughness height. Additionally, it was checked if modification in liquid nitrogen had influence on in vitro biostability. PCL\_LN and PCL\_C samples were incubated in phosphate buffered saline (PBS) during 72h in 80 degrees. Changes were monitored by measuring power hydrogen (pH). Mechanic properties (including Young's modulus, E,

and tensile strength, RM) were investigated by measuring tension strength using the universal testing machine Zwick-1435 (conditions of experiment: speed - 50mm/min, working length - 20mm).

## Results and discussion

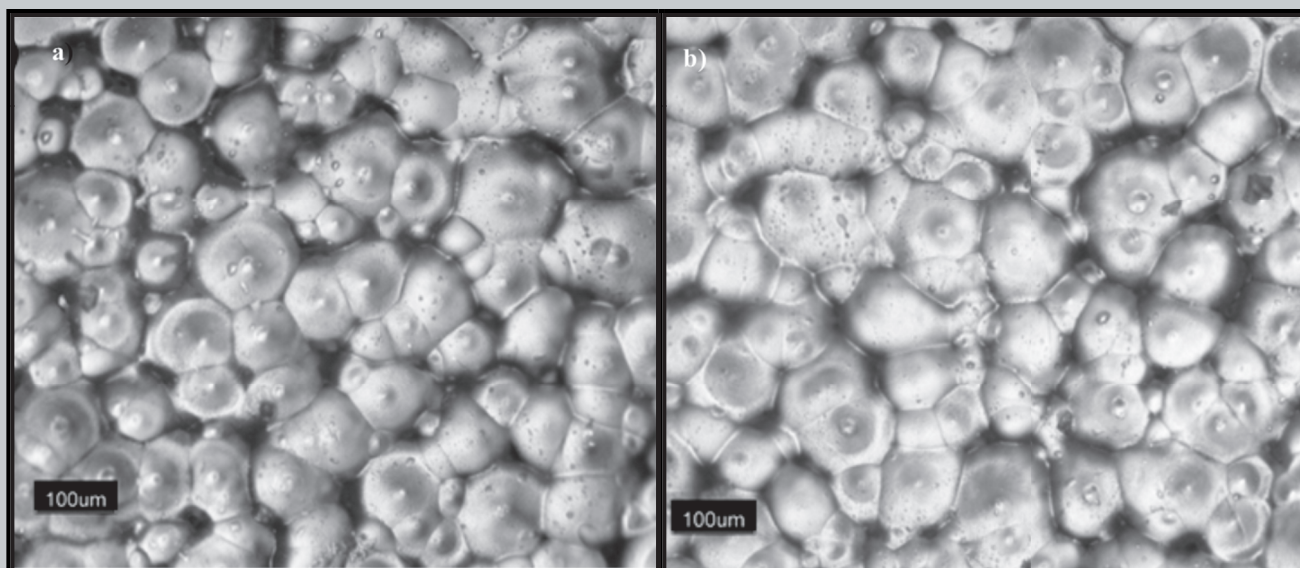
After 48 hours of incubation in PBS no changes of pH value were noticed. This proved the materials biostability. Polymer can be safely used for producing medical devices.

**TAB. 1. Power hydrogen values before and after 72h of incubation in PBS's.**

Incubation time [h]	pH value	
	PCL_LN	PCL_C
0	7,24	7,24
72	7,25	7,25

Observations of modified and control samples were obtained using optic and fluorescence microscope. The images confirmed semi-crystalline microstructure of material. It contained regular, flat allotriomorphic grain called lamella. This form combined together into elongated forms (fibrils), which create polycrystalline spherulites with rotational symmetry due to branching and folding fibrils' structure (FIG.1a-b). The PCL\_LN sample contained mostly spherulites which size ranged 100-150 $\mu$ m. After thermal modification (freezing in liquid nitrogen) the average size, amount and locations of spherulites were not changed (FIG.1b). There was no difference in spherulites size between upper and down part of samples. In the pictures of upper, more visible were spherulites than fibrils.

Further surface characteristic were provided using atomic force microscopy. Measuring the three parameters of surface roughness ( $R_a$ , RMS and AvgH) discovered that all parameters had comparable values for both samples. Both films had roughness in nanometric scale. The average sizes of spherulites were similar for both materials. There appeared some small differences in nanotopography. Lamella were more visible in control samples (FIG.2a), but after thermal modification there appeared amounts of lamella creating compacted spherulites (FIG.2b). Moreover, there appeared visible nanometric roughness on the PCL\_C surface caused



**FIG. 1. The pictures of films' surfaces (PCL\_C: a; PCL\_LN: b).**

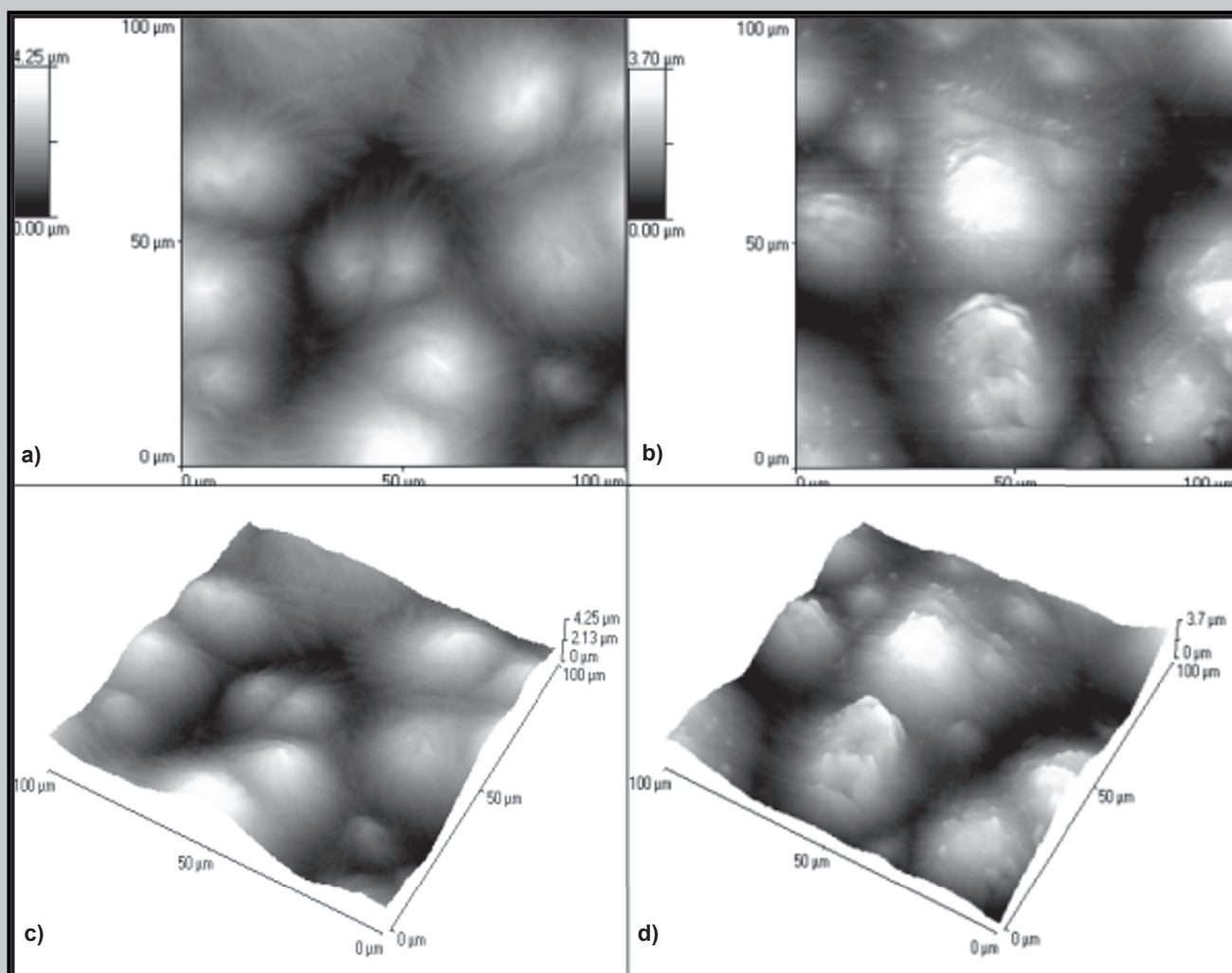


FIG. 2. 2D and 3D images of materials' surfaces: a,c) PCL\_LN, b,d) PCL\_C. Area of measurements: 20x20  $\mu\text{m}$ .

by recrystallization.

Amount and height of peaks and valleys did not have any influence on surface parameters ( $R_a$ , RMS,  $\text{AvrH}$ ). Modified material had

TAB. 2. Parameters of roughness for PCL\_LN and PCL\_C ( $n=6$ ).

Parameter [ $\mu\text{m}$ ]	PCL_LN(down)	PCL_LN(upper)	PCL_C(down)	PCL_C(upper)
$R_a$	2,61	1,97	2,42	3,56
$R_t$	37,94	42,91	31,67	48,63
$R_z$	15,56	14,54	15,88	13,07

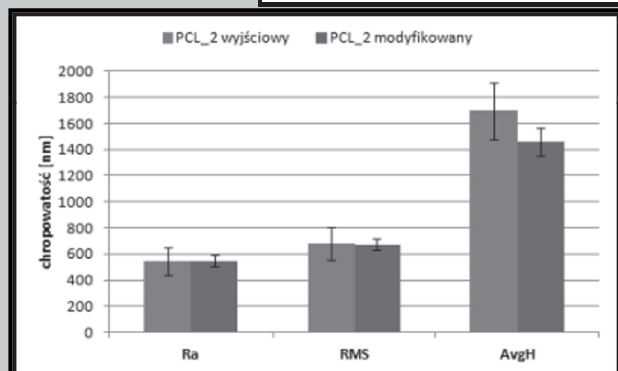


FIG. 3. Average parameters of roughness ( $R_a$ , RMS,  $\text{AvgH}$ ) for films: PCL\_LN and PCL\_C (area: 100x100  $\mu\text{m}$ ).

lower value of arithmetic average of roughness height compared to control sample. Changes differed within standard deviation (FIG.3).

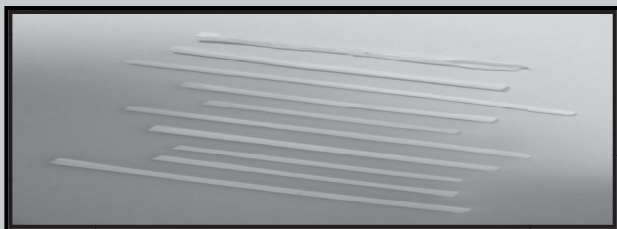
Samples characteristic of microtopography was obtained by roughness measurements. The arithmetic average of absolute values of entire profile was 2,61 $\mu\text{m}$  for upper side of control sample and 2,04 $\mu\text{m}$  for down side. After modification this values decreased to 2,42 $\mu\text{m}$  (upper side) and 2,0 $\mu\text{m}$  (down side). High  $R_t$  and  $R_z$  values of samples were evidence of notable roughness of polymer film. Maximum height of the profile ( $R_t$ ) of upper side of sample did not exceed 40 $\mu\text{m}$  and for down side was twice smaller. Decrease of  $R_t$  (about 6,27 $\mu\text{m}$  lower) and  $R_z$  parameters (0,31 $\mu\text{m}$  lower) could prove the reduction of material roughness after modification. The values of measured parameters proved the similar roughness of materials before and after modification (TAB.2).

The results of mechanical parameters are shown in TABLE 3. The shape of force-deformation plots depended

TAB. 3. The values for tensile strength.

Average values	PCL_C	PCL_LN
Young's modulus, $E$ [MPa]	134,8 $\pm$ 29,18	276,5 $\pm$ 102,63
Tensile strength, $R_M$ [MPa]	9,68 $\pm$ 0,92	16,95 $\pm$ 1,79





**FIG. 4. Forming tubes from film samples.**

on used modification of material. Control sample behaved like classic polymer - after yield point material stretched decreasing gradually its strength. Modified material had better parameters of strength what was connected with recrystallization and orderly structure of material (increasing polymer chains arrangement) increasing tensile strength. The evidence of this was change of Young's modulus - for modified material the value was 80% higher than for control sample.

Mechanical investigation proved that modified material had high elasticity and tensile strength, which would decrease risk of mechanical deformation and destruction of catheter during inserting or removing. Due to no significant difference in micro and nanostructure material could be used in xenotransplantations and embryology. Moreover, first experiments connected with forming tubes from films proved material convenience. Tubes were formed by hand in the water condition in the temperature lower than 40 degrees (FIG. 4).

## Conclusions

The study showed that modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) is biostable and biocompatible material. Mechanical investigation proved that modified material had higher elasticity and tensile strength than control sample, what will decrease risk of mechanical deformation and destruction of catheter during inserting or removing. The study proved that poly( $\epsilon$ -caprolactone) modified with liquid nitrogen can be used for medical devices such as catheters.

## Acknowledgment

*This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, project no N N302 632140.*

## References

- [1] Patel S.R., Caldamone A.A. The history of urethral catheterization. *Medicine and health Rhode Island*. 2004 Aug; 87(8): 240-2
- [2] Lawrence E.L., Turner I.G. Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Medical Engineering & Physics*. 2005 Jul; 27(6): 443-453
- [3] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. California: Elsevier Inc.; 2004
- [4] Kumon H., Hashimoto H., Nishimura M., Monden K., Ono N. Catheter-associated urinary tract infections: impact of catheter materials on their management. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001 17(4): 311-316
- [5] Kowalczyk D., Ginalska G., Golus J. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010 402(1-2): 175-183
- [6] Bartoszewicz M., Sacewicz A. Biofilm w zakażeniach odcewnikowych – etiologia i metody prewencji, *Przegląd Urologiczny*, 2008 (48), 125-129
- [7] Bernd J. Vascular catheter-related infection: aetiology and prevention, *Current Opinion in Infectious Diseases* 2003, 6-4
- [8] Sherertz RJ, Wesley E, Westbrook DM, et al. Education of physicians-in-training can decrease the risk for vascular catheter infection. *Ann Intern Med* 2000; 132:641-8.

# RESORBABLE SCAFFOLDS MODIFIED WITH COLLAGEN TYPE I OR HYDROXYAPATITE: IN VIVO STUDIES ON RABBITS

ELŻBIETA PAMUŁA<sup>1\*</sup>, MACIEJ ORZELSKI<sup>2</sup>, PIOTR MALISZ<sup>3</sup>,  
ŁUCJA RUMIAN<sup>1</sup>, ELŻBIETA MENASZEK<sup>1,4</sup>, BARBARA NOWAK<sup>4</sup>,  
PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>5</sup>, PIOTR SILMANOWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup>UNIVERSITY OF LIFE SCIENCE, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,  
DEPARTMENT AND CLINIC OF ANIMAL SURGERY,  
30 GŁĘBOKA STR., 20-612 LUBLIN, POLAND

<sup>3</sup>JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,  
UNIVERSITY DENTAL CLINIC,  
4 MONTELUPICH STR., 31-155 KRAKOW, POLAND

<sup>4</sup>JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,  
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY,  
9 MEDYCZNA STR., 30-688 KRAKOW, POLAND

<sup>5</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTER OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

\*MAILTO: EPAMULA@AGH.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 115-117]

## Introduction

Aliphatic polyesters, for example copolymers of L-lactide and glycolide (PLGA), are very attractive materials to be processed into temporary scaffolds for bone and cartilage tissue engineering [1,2]. Several experiments performed in our group showed that the PLGA scaffolds support growth and differentiation of osteogenic cells [3,4] and are biocompatible with soft tissue in the animal model [5]. Besides, numerous studies confirmed that surface modification strategies with the use of inorganic phases (e.g. calcium phosphates) or biomolecules (e.g. collagens, glycosaminoglycans) may provide additional beneficial effect on bone tissue healing and regeneration [6]. However, in the case of 3D porous scaffolds it is difficult to deposit homogenous layer of inorganic/organic phases on the pore walls within the whole volume of the scaffolds. It results from relatively high surface area, tortuosity of the pores and diffusion-limited phenomena. Therefore particular strategies have to be applied to modify the complete volume of the scaffolds. In our approach we use vacuum to remove air from the pores and thus to enhance the modification solution to penetrate all pores.

The aim of this study was to: i) modify the entire volume of the PLGA scaffolds with hydroxyapatite (HAP) or collagen, and ii) find out if applied modifications are beneficial for the healing process in critical-size osteochondral defects in rabbits.

## Materials and methods

### Scaffolds manufacturing, modification and characterization

PLGA with molar ratio of L-lactide to glycolide 85:15 ( $M_n=100$  kDa,  $d=2.1$ ) was synthesized according to a method described previously [7]. Cylindrical porous scaffolds

(diameter 4 mm, height 5 mm) were obtained by an innovative solvent casting/salt particulate leaching method [4]. The size of the salt particles was 250-320  $\mu$ m and their volume fraction was 85%. The scaffolds were modified with hydroxyapatite (HAP) by incubation in simulated body fluid (SBF) for 12 days [8] and with collagen (type I, bovine origin, Sigma) by soaking the scaffolds in collagen solution (40  $\mu$ g/ml) for 24h. Modification media (i.e. SBF or collagen solution) were forced to penetrate the whole volume of the scaffolds by applying a vacuum. Afterwards the scaffolds were washed 3 times in tap water (in the case of SBF modification) and in UHQ water (in the case of collagen adsorption).

The scaffolds were characterized by scanning electron microscopy (Nova NanoSEM, FEI) equipped with EDS analyzer, FTIR spectroscopy (FTS Digilab, BioRad) and X-ray diffractometry (XRD, Panalytical X'Pert Pro system).

### Scaffolds in vivo evaluation in New Zealand rabbit model

The research protocol was approved by Local Ethic Committee (University of Natural Science, Lublin, Poland, No 43/2008; 01 July 2008). Three types of scaffolds: without modification (PLGA), enriched with collagen (PLGA/coll) and enriched with hydroxyapatite (PLGA/HAP) were sterilized with oxygen peroxide plasma (Sterrad 120, ASP, J&J). Sham operation (defect created and but not filled with a scaffold) acted as control. Six animals were used in this study, i.e. both knees of the animals were operated.

#### General anesthesia

The mixture of xylazine and ketamine was administered by intramuscular injection (5 mg/kg xylazine and 35 mg/kg ketamine). The state of sedation and analgesia were achieved. The surgical site was prepared, the area surrounding the knee joint was shaved, and a venflon was placed into the marginal ear vein (v. auricularis marginalis). After 10 min general anesthesia was induced by intravenous administration of ketamine. To maintain the anesthesia ketamine was used as a continuous intravenous infusion using an infusion pump at a dose of 0.5 mg/kg/min.

#### Knee arthrotomy

Approach to the knee was obtained by making an incision on the side of the knee. The incision began at about 1 cm distal part of femur to achieve a level 2 cm below the tibial tuberosity. The tissues were prepared along the same incision line, fascia lata was cut laterally on the block of the knee, then straight along the patellar ligament at a distance of about 7 mm from it, and then the capsule of the knee was cut. Patella with vastus lateralis muscle was moved medially – showing the surface of the femoral trochlea (FIG. 1 A).

#### Scaffolds' implantation

In the middle of the trochlear groove of the femur a round hole in the shape of a cylinder with a diameter of 4 mm and a depth of 5 mm, covering the subchondral layer was created for the implant (FIG. 1B). The hole was flushed with isotonic solution of NaCl 0.9%. In the prepared place the scaffold was inserted (FIG. 1C,D). Tissues were apposed in layers anastomosed with absorbable sutures (Polyglactine 910, 3/0) according to anatomical alignment (FIG. 1E). Non-absorbable suture material (Polyamide, 3/0) was used on the apposed skin (FIG. 1F).

#### Postoperative management

After recovery rabbits were able to freely move in the cages. Medication with analgesic was administered (butorphanol at a dose of 0.1 mg/kg). Sul-Tridin 24% was also

administered at a dose of 30 mg/kg once a day for five days. After ten days skin sutures were removed.

#### Postoperative observation

During the post operative time most of the animals revealed no signs of knee dysfunction. Within 2-3 days after surgery individual animals showed lameness of the first degree, which had no significant effect on the general condition of the animals. One rabbit in the study group (without any scaffold) showed a significant swelling of the knee sustained in a week after surgery. This rabbit showed a first degree lameness with limited range of motion at the stifle joint. After the euthanasia it was determined that the joint had inflammation, an increased amount of synovial fluid, and degenerative changes that significantly deformed the surface of the joint and were the cause of the clinical changes described in the functioning of the joint.

#### Euthanasia

After four weeks from the operation the rabbits were introduced into a state of general anesthesia with xylazine and ketamine. After reaching deep anesthesia euthanasia was performed by intracardiac injection of sodium pentobarbital. Then, the distal femoral epiphyses were excised, placed in 4% formalin and collected for further testing.

#### Cone Beam Computed tomography (CBCT)

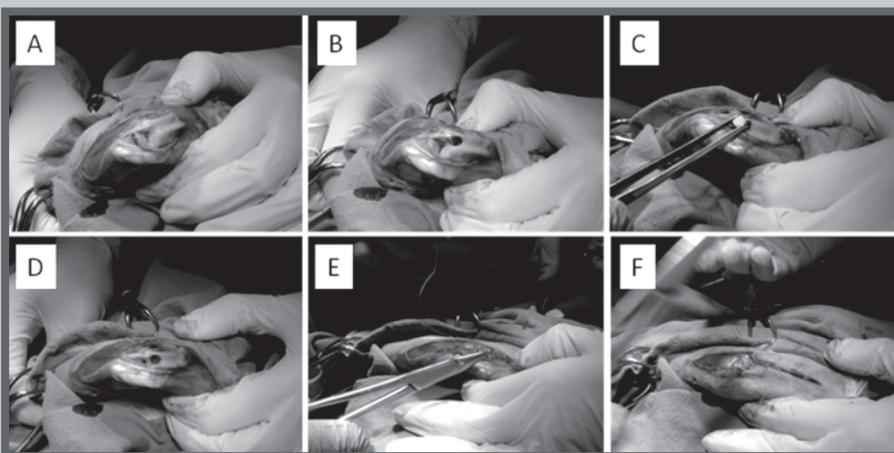
The CBCT evaluations of the femora were carried out on GXCB-500/i-CAT (Gendex Dental System, Italy) volumetric tomograph at an isometric voxel size of  $125 \times 125 \times 125 \mu\text{m}^3$  and total scanning time of 23 s. Data acquisition and treatment was performed on iCAT Vision program working in DICOM standard.

#### Histology

The formalin from rabbit distal femoral epiphyses was removed by washing the specimens in tap water for two days. As a decalcification agent hydrochloric acid (TBD-1 Rapid decalcifier, Thermo Shandon Ltd, UK) was used for 5 days. After that the specimens were immersed in graded ethanol series for 24h each and twice for 1h in xylene. Finally, the samples were bathed in liquid Histoplast paraffin at  $56^\circ\text{C}$  for 3 days, and then embedded in a fresh portion. The embedded paraffin blocks were cut by rotary microtome (RM 2145, Leica Microsystems, Germany) for  $9\text{-}\mu\text{m}$  thick sections. After deparaffinization of tissue slices in xylene and rehydration in ethanol series the specimens were stained with Masson-Goldner trichrome according to standard procedure, dehydrated again and mounted in universal histological mounting medium.

## Results and discussion

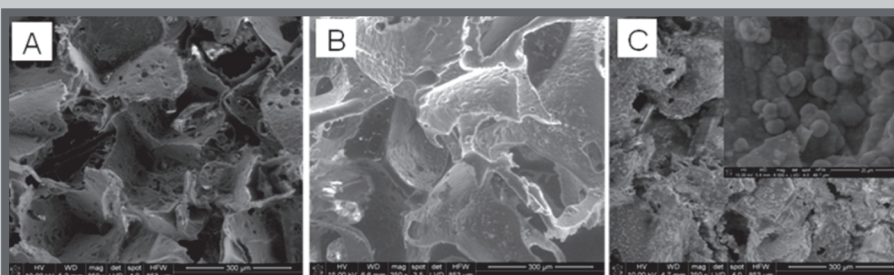
The goal of this study was to modify entire volume of the PLGA scaffolds with natural bone extracellular



**FIG. 1.** Surgical procedure of scaffolds implantation into rabbit femoral trochlea: A – exposed surface of femoral trochlea, B – drilled hole in the middle of the trochlear groove, C – placing the scaffold, D – osteochondral defect filled with the scaffold, E – tissues apposed with absorbable sutures, F – skin apposed with non-absorbable sutures.

matrix components, i.e. collagen type I and hydroxyapatite with the aim to enhance healing/regeneration of tissues in experimentally created osteochondral defects in rabbits.

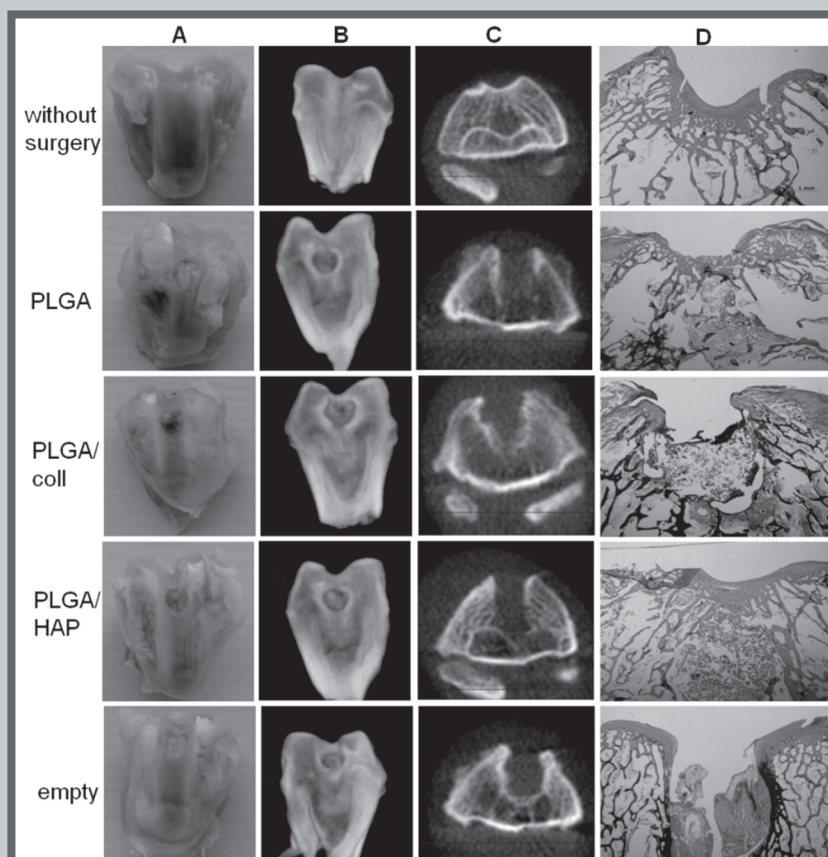
FIG. 2 shows the microstructure of the scaffolds registered under scanning electron microscope. The scaffolds had interconnected pores of a size close to the size of porogen particles used in the process of their preparation, i.e.  $250\text{--}320 \mu\text{m}$ . PLGA/coll scaffolds looked similar to the scaffolds without modification, but EDS analysis revealed presence of 2.5% of nitrogen originating from collagen. In PLGA/HAP scaffolds pore walls were more rough due to mineral deposits. Under higher magnifications, i.e.  $4000\times$ , round cauliflower-shape forms on the pore walls were visible in the scaffolds submitted to incubation in SBF (FIG. 1C, insert). EDS analysis confirmed that on PLGA scaffolds after contact with SBF calcium and phosphorus were detected and Ca/P ratio was 1.6, which is similar to that of hydroxyapatite. The FTIR and XRD examinations also confirmed presence of fine-crystalline hydroxyapatite phase (data not presented). The same results were observed on the scaffolds surfaces as well as in the cross-sections, what proves that the entire volume of the scaffolds was modified with collagen or hydroxyapatite.



**FIG. 2.** SEM microphotographs of PLGA scaffolds non-modified (A), collagen- (B) and HAP-modified (C), original magnification  $350\times$ ; insert  $4000\times$ .

In the first column of FIG. 3A digital camera pictures of intact femoral trochlea, trochleas with experimental defects filled with the scaffolds (PLGA, PLGA/coll, PLGA/HAP) as well as empty defect after 4 weeks from the surgery are presented. In all specimens the area where the defect was created was clearly distinguishable and hyaline cartilage was not healed. Cone beam computed tomography examinations in 3D projection (FIG. 3B) show that the defects were not totally filled with mineralized tissue, however 2D cross-





**FIG. 3. Macroscopic appearance – A, CBCT-3D reconstruction – B, CBCT cross-section – C and histological examination – D of rabbit femoral trochlea without the surgery and after 4 weeks from the surgery treated with scaffolds: PLGA, PLGA/coll and PLGA/HAP as well as sham operation – empty defect; Masson-Goldner staining.**

sections (FIG. 3C) show that the widths of the defect treated with PLGA/HAP and PLGA were much smaller than those of empty defect and treated with PLGA/coll scaffold. It suggests that PLGA scaffolds were beneficial for bone ingrowth and presence of hydroxyapatite enhanced this process.

Histological picture (FIG. 3D, first panel) shows typical structure of intact femoral trochlea. Thanks to trichrome Masson-Goldner staining the light green hyaline cartilage was visible on the top. Below it there was trabecular bone: stained in light green mature bone matrix, whereas the osteoid was coloured red. In the empty defect only fibrous tissue was visible (FIG. 3D, last panel). Interestingly, presence of scaffolds clearly enhanced bone/cartilage tissue regeneration. The best results were achieved for PLGA/HAP and PLGA scaffolds, where the ingrowth of newly formed trabeculae started from the peripheries toward center of the defects. The more developed hyaline cartilage was visible for PLGA/HAP scaffolds. Bone and cartilage healing seemed to be retarded on PLGA/coll, probably due to higher inflammatory response to the collagen of bovine origin.

## Conclusions

In summary, the results show that PLGA scaffolds with defined microstructure (porosity and pore size) can be modified with a thin layer of collagen type I. Moreover in the entire volume of the scaffolds hydroxyapatite deposits can be created via biomimetic method. The in vivo experiments in rabbit model showed that bone formation was more advanced in the case of the scaffolds enriched with HAP. In the case of PLGA/coll scaffolds the extent of inflammation in surrounding tissues was much higher and healing was delayed as compared to non-modified PLGA scaffolds.

Histological observations show that the presence of PLGA scaffolds is critical for the regeneration of osteochondral defects made in the knee of rabbits. In a sham operated knees the regeneration process was limited and the defects were filled with fibrous connective tissue instead of hyaline cartilage and bone tissue. CBCT examinations showed that bone mineralization was more advanced in the defects treated with PLGA/HAP scaffolds.

In brief, the results demonstrate that the PLGA scaffolds enriched with HAP have the highest potential for the treatment of critical-size osteochondral defects in rabbits.

## Acknowledgements

*This study was financed from the Polish Budget Funds for Scientific Research within the years 2009-2012, as a research project No N507280736.*

## References

- [1] Fan W, Wu C, Miao X, Liu G, Saifzadeh S, Sugiyama S, Afara I, Crawford R, Xiao Y., Biomaterial scaffolds in cartilage-subchondral bone defects influencing the repair of autologous articular cartilage transplants. *J Biomater Appl.* 2012 Jun 8. [Epub ahead of print] PMID:22684516.
- [2] Zhang Y, Yang F, Liu K, Shen H, Zhu Y, Zhang W, Liu W, Wang S, Cao Y, Zhou G., The impact of PLGA scaffold orientation on in vitro cartilage regeneration. *Biomaterials.* 2012 Apr;33(10):2926-35. Epub 2012 Jan 16. PMID:22257722.
- [3] Pamula E, Bacakova L, Filova E, Buczynska J, Dobrzynski P, Noskova L, Grausova L. The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Jan;19(1):425-35.
- [4] Pamula E, Filová E, Bacáková L, Lisá V, Adamczyk D. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J Biomed Mater Res A.* 2009 May;89(2):432-43.
- [5] Pamula E. and Menaszek E. In vitro and in vivo degradation of poly(L-lactide-co-glycolide) films and scaffolds *J Mat Sci: Mat Med* 2008, 19, 2063-2070.
- [6] C. Rentsch, B. Rentsch, A. Breier, K. Spekl, R. Jung, S. Manthey, D. Scharnweber, H. Zwipp and A. Biewener, Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered polycaprolactone-co-lactide scaffolds: a pilot study on rats *J Biomed Mater Res* 2010, 95A, 964-972.
- [7] Dobrzyński P, Kasperczyk J, Janeczek H, Bero M. Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(acac). *Macromolecules* 2001; 34: 5090-5098.
- [8] Douglas T, Pamula E, Hauk D, Wiltfang J, Sivananthan S, Sherry E, Warnke PH. Porous polymer/hydroxyapatite scaffolds: characterization and biocompatibility investigations. *J Mater Sci Mater Med.* 2009 Sep;20(9):1909-15.

# EVALUATION OF REPAIR OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS IN RABBITS USING NEW COMPOSITE BIOMATERIALS DURING THREE-MONTH OBSERVATION

B.ŻYLIŃSKA<sup>1</sup>, E.STODOLAK-ZYCH<sup>2</sup>, K.NOWICKA<sup>2</sup>,  
P.SILMANOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UP—UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IN LUBLIN,  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,  
DEPARTMENT AND CLINIC OF ANIMAL SURGERY,  
30 GŁĘBOKA STR., 20-612 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup>AGH—UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 KRAKOW, POLAND

## Abstract

*In this work nanocomposite porous pins were implanted into rabbit knees. The pins were made of biodegradable synthetic poly-L/DL-lactide (80:20) which was modified with nanometric hydroksyapatite particles (HAp) and covered with biopolymer layer of sodium alginate (NA). In vivo experiments were conducted on a 4-element group of the New Zealand rabbits. Osteogenesis was observed using scanning electron microscope (SEM/EDS) after 12 weeks of implantation.*

**Key words:** osteochondral defects, regenerative medicine, scaffolds, hydroksyapatite, alginate  
[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 118-119]

## Introduction

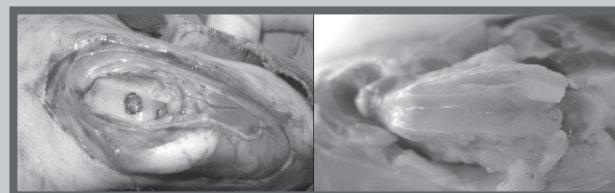
Repair of osteochondral defects is the major clinical problem in orthopedics and still an unsolved issue. Articular cartilage is avascular and relatively acellular with low level of mitotic activity. Thus it displays a poor capacity for self-repair. Fibrocartilaginous substitute tissue which spontaneously fills osteochondral defects has completely different molecular composition and biomechanical properties. With time it tends to degenerate and fails to withstand loading during the joint movement. Nowadays, materials for tissue engineering and materials support for regenerative medicine are the most promising and alternative in the treatment of osteochondral defect. The main goal is to develop a new biomaterial that will enhance and encourage repair of such defects so the newly formed tissue would mimic in the largest extent the precise composition of the native one which is vital in regaining and maintaining a fully functional joint. An ideal scaffold should possess suitable stability, biocompatibility, permeability, porosity and three-dimensional structure. It should also have osteoconductive and chondroconductive properties to promote proliferation and migration of cells and to enhance the tissue ingrowth.

In this regard, increasing attention has been given to biodegradable polymers such as PLDLA, PCL, PGLA and biopolymers such as alginates, hyaluronan, chitosan (CS) and its compositions. Biopolymers could improve osteoblasts and chondrocyte attachment to poly(L-lactic acid) (PLLA), and stimulated of increase cell adhesion, proliferation and cells metabolism activity [1-2]. The intra-articular injection

of chitosan has shown an increase of epiphyseal cartilage on tibial and femoral joints with simultaneous activation of chondrocyte proliferation. In order to increase cellular adhesiveness of chitosan Some authors shown that chitosan/alginate-hyaluronan complexes with or without covalent attachment of RGD-containing proteins could stimulated cells grown [3]. Implantation of chondrocyte-seeded scaffolds into the rabbit knee with cartilage defects caused their partial repair. Another authors modified three-dimensional biodegradable PLA-alginate scaffold by TGF- $\beta$ 1 to support the attachment/retention of osteoblasts and for chondrogenic differentiation of MSCs, while conferring mechanical stability to the construct [4]. Marijnissen et al. compared demineralized bone matrix to a PLA-PGA fleece, both used in conjunction with alginate gel, in their capacity to support the chondrocytic phenotype in vivo. Structural homogeneity as well as the number of type II collagen positive cells was found to be higher in the PLA-PGA-alginate constructs, once again confirming the well-suited applicability of such biodegradable polymers to the repair of cartilage and bone defects [5]. The most promising materials for stimulated bone tissue regeneration are polymeric nanocomposites containing such ceramic nanoparticles as; HA, TCP or SiO<sub>2</sub>. A small amount of the nanoparticles improves bioactivity of the material and causes its better osteointegration with the surrounded bone tissue [6]. Nanocomposite materials produced and investigated during this study combined two properties of traditional biomaterials i.e.; bioactivity which supports osteoblast proliferatin and biopolymer structure which is suitable for adhesion and proliferation of chondrocytes.

## Materials and methods

Nanocomposite sponges formed in pin shape were used in our research. These implants were made of poly (L/DL) lactide (PLDLA; 80:20, Purasorb, PURAC) enriched in bioactive nanoparticles of hydroksyapatite (3-60 nm, HA, Sigma-Aldrich) and sodium alginate (NA). The materials were obtained by a modified solvent casting/salt particulate leaching method using sodium chloride as pore former leading to pores of 100-300  $\mu$ m diameter. Cylindrical pins were obtained with dimensions of 4x6 mm. Finally they were immersed in 1% solution of NA (FGM Biopolimer, Norway) and dried in vacuum (35oC/48h). In vivo experiment was conducted on the four New Zealand rabbits. Under general anaesthesia (using xylazine 5 mg/kg and ketamine 25 mg/kg) a lateral approach to the stifle joint under sterile conditions was made. After lateral arthrotomy and medial patellar luxation the femoral trochlea was visualized. Using a drill a cylindrical hole (4x5 mm) was created in trochlear groove imitating osteochondral defect (FIG.1). Then the defect was filled with the prepared biomaterial using press-fitting method. The joint capsule, fascia and skin were closed in a routine manner. After the operation all rabbits were allowed to move freely in cages without any splints. The animals were sacrificed at 3 months after implantation. The femoral

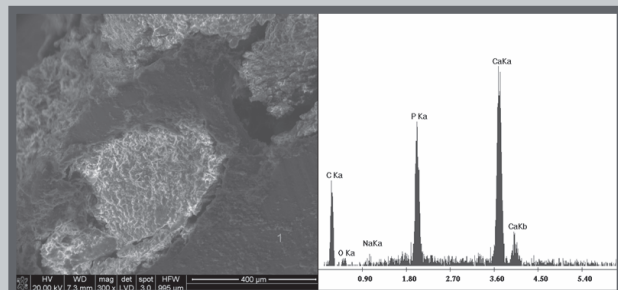


**FIG. 1. Macroscoping appearance of tissue defect after 3 months from surgery (a). Intraoperative view of a defect in trochlear groove filled with the implant material (b).**



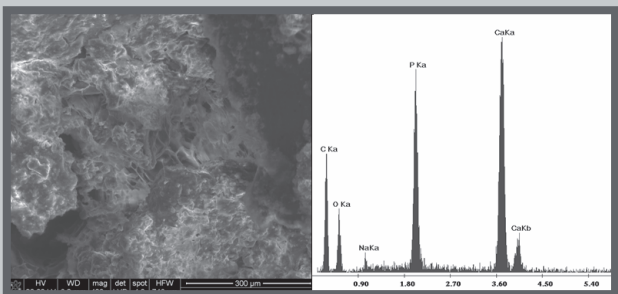
trochleas were harvested, fixed in 4% paraformaldehyde solution and submitted to further analysis. The specimens were adequately cut and underwent dehydration using ethanol in different concentrations (20, 40 i 97%) for 24h. Scanning electron microscope (Nova NanoSEM, FEI) observation of multilevel microstructure was performed.

## Results



**FIG. 2.** SEM microphotograph of the implant surrounded by the bone tissue (a), EDS point analysis of newly created tissue (point 1).

Preliminary studies in vitro condition showed that biomaterials were biocompatible [7]. High porosity of these sponges (diameter of pores was 100-300 μm) and a system of interconnective pores makes them suitable for cells migration, deposition and blood vessels ingrowth. Three dimensional structure mimics internal arrangement of bone and cartilage extracellular matrix. This is conducive to interactions between cells and matrix components. In the organism's environment the sodium ions from NA are exchanged with the calcium ions. Newly formed calcium-sodium alginate is more solid and enhances faster defect consolidation. SEM microphotographs showed complete integration between implant and bone surfaces (FIG.2a-3a). By means of EDS analysis (Genesis) the elemental composition of specimen was confirmed. As elements to detect were chose phosphorus, calcium and sodium. Punctual EDS analysis in the region of biomaterial – appears as smooth place on the picture – showed increased concentration of Na, Ca and P. In the region of bone – rough surface on the picture - minimal amount of Na and increased ratio of Ca:P were detected. Increased Ca and P concentration compared to carbon confirms the presence of bone. The linear EDS analysis also detected characteristic distribution of elements depending on particular regions of specimen. In the segment that was relevant to implant sodium concentration was high. On the contrary – in the section of bone sodium concentration was minimal. The average EDS analysis of the whole region of implantation showed on FIG.3b confirmed high concentrations of Ca and P which indicates good integra-



**FIG. 3.** SEM microphotograph of joint between the implant and the bone tissue (a), Average EDS analysis of the implant cover by tissue (b).

tion and colonization of material by new bone tissue. It was proved that the tested composite biomaterials because of its porosity, composition and bioactivity enhance cells migration and deposition; support cells organization and thus promote effective repair of osteochondral defects.

## Conclusion

It was shown that the nanocomposite polymer implant covered with the biopolymer stimulated regeneration of osteo tissue. Bioactive, resorbable polymeric nanocomposite materials containing ceramic nanoparticles are interesting implant materials which fulfil requirements of the regenerative medicine. In the next step of analysis of the osteointegration and stimulation of osteo-tissue regeneration process histochemical studies ought to be performed.

## References

- [1] Xiaoxiao Cai, Yunfeng Lin, Guomin Ou, En Luo, Yi Man, Quan Yuan, Ping Gong, Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system, *Cell Biology International* 31 (2007) 776-783.
- [2] Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS: A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 2003, 23:37-49.
- [3] Schaefer D, Martin I, Shastri P, Padera RF, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials* 2000, 21:2599-2606.
- [4] Caterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR, Tuan RS: Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam *J Biomed Mater Res* 2001, 57:394-403
- [5] Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA: Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 2000, 21:571-580.
- [6] Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, Griffith LG, Landeen LK, Ratcliffe A: A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials* 2002, 23:4739-4751.
- [7] A. Frączek-Szczypta, E. Stodolak, A. Wiecheć, M. Błażewicz: Preliminary investigations of polylactide-based nanocomposites as potential materials for bone cells proliferation, *Engineering of Biomaterials* 2010, 96-98: 1-3.



# INFLUENCE OF SURFACE TOPOGRAPHY AND MORPHOLOGY OF PU/PLA FILMS ON FIBROBLASTS PERFORMANCE

BEDNARZ P., KROK M., LASKA J.

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

**Keywords:** contact angle, roughness, morphology, cell adhesion, fibroblasts

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 120-122]

## Introduction

Interfaces between engineered materials and cells play a crucial role in biomedical applications where the interaction between cells and the material surface dictates cell performance and therefore, the success of the implanted device [1]. Extracellular matrix (ECM) components and peptides, topographical features, support cells and growth factors have been extensively studied for the creation of biomimetic materials that control cellular responses such as adhesion, morphology and/or differentiation [2-5]. Substrate topography can influence cell morphology, its behaviour, and cell-substrate interactions, as well as cell-cell interactions [6]. Effects of topography at all scales have been studied on many different cell types including cells of the central and peripheral nervous systems [7]. Surface hydrophilicity/hydrophobicity have been widely reported to be a key factor in behaving of proteins and cells-surface interactions [8]. It is well known that both highly hydrophilic and highly hydrophobic surfaces are not favourable for cell attachment. Surfaces with moderate wettability are able to adsorb proper amounts of adhesive proteins, and, at the same time, enable to preserve their natural conformations, what stimulates positive cell response [9].

Polymer blending is an effective method of modifying material properties as well as surface properties [10]. In practise, obtaining homogenous mixture of two or more polymers is rather difficult because of their high molecular weight. Nonetheless, the method is considered to be one of the easiest, cheapest, and the most useful. Polylactide is a biodegradable thermoplastic and because of its good mechanical properties, biodegradability and non-toxic degradation products, it is being used for number of biomedical applications [11]. Because of their biocompatibility and possibility to obtain a broad range of mechanical properties polyurethanes have been extensively investigated as both biostable and biodegradable biomaterials. They could be applied as long lasting medical implants, such as cardiac pacemakers and vascular grafts [12] or biodegradable cardiovascular implants, artificial skin, cancellous bone graft substitutes and scaffolds for tissue engineering [13].

In our studies blends of polylactide and biodegradable polyurethane were investigated. The aim of this work was to evaluate cytotoxicity of the polymer mixture, and assess the influence of the surface parameters of the polymer films on fibroblasts adhesion, proliferation and secretion.

## Materials and methods

### Materials

Mixture of polylactide and polyurethane was tested in this research. Both used polymers were of biomedical grade and

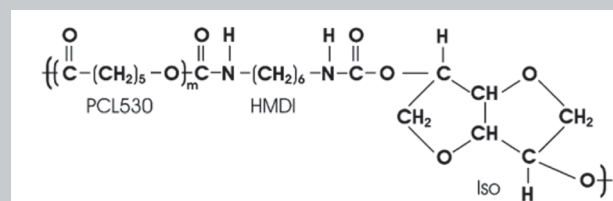


FIG. 1. Chemical structure of polyurethane used in the study.

were used without further purification. Polyurethane (PU) was purchased from GOY Bayer (Germany). PU molecules are built up of hexamethylenediisocyanate (HMDI) rigid segments, polycaprolactone (PCL) flexible segments and isosorbital as a chain extender (FIG. 1). Polylactide (PLA), consisting of 80% poly-L-lactide and 20% poly-DL-lactide was purchased from Purac (Netherlands). The N,N-dimethylformamide (DMF) of analytical grade was purchased from POCh (Poland).

### Preparation of polymer free-standing films

Blends were prepared by dissolving both polymers in dimethylformamide to obtain a 10 wt.% solution. Weight ratio of PU to PLA was 4:1. The mixture was stirred with a magnetic stirrer for at least 48h at ~50°C, and then cast on glass Petri dishes. The films were dried at 50°C under vacuum for 48 hours. The films were sterilised with the use of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cold plasma technique (Sterrad, ASP, J&J, USA).

### Determination of physical properties of the films

The water contact angle of obtained PU/PLA films was measured using sessile drop method on Drop Shape Analysis System (DSA Mk2, Krüss, Germany). Ten measurements on each side of the film were accomplished. The data presented are average of ten measurements ( $\pm$  standard deviation).

Prior to taking roughness measurements a glass slide with the thin PU/PLA films was fixed onto a mount with a double-sided adhesive tape to prevent the samples from moving during the test. Roughness was measured with using a profilometer (Hommelwerke, Germany), equipped with cone shaped diamond tip (radius of 5  $\mu$ m). The velocity of the moving cone was 0,50 mm/s. Each sample was measured ten times on both sides. The parameters calculated were surface average roughness ( $R_a$ ), the maximum height of the profile ( $R_t$ ) and the ten-point height of irregularities of surface ( $R_z$ ). All the given values are presented as average of ten measurements ( $\pm$  standard deviation).

### Determination of biological properties of the films

The sterilized films were placed in 24-well plate (Nunc, Denmark), both surfaces of the films (top surface, i.g. air-cured, and bottom surface, i.g. glass-cured) were tested and as a control the bottom of the well tissue culture polystyrene-TCPS was used. NIH 3T3 mouse embryonic fibroblast cells were cultured on the studied materials in DMEM (PAA, Austria) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin at 37°C under 5.0% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours and 7 days. Initial cell density was  $2.5 \cdot 10^4$  cells per well.

MTT test was used for cells viability measurements. At each time point MTT (Sigma Aldrich, Germany) solution (mg/mL) was added to the wells with tested films and incubated for 3h, after that the reaction was stopped with dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was measured on Multiscan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, USA) at 540 nm. To calculate the cell number calibration curve was prepared from by analyzing known number of

cells (from  $1.0 \cdot 10^4$  to  $5.0 \cdot 10^5$ ).

The total content of protein and nitric oxide (NO) level in the cells' supernatant was carried out by BCA protein assay and the Griess reaction, respectively. The BCA (bicinchoninic acid) reagent, prepared just before the assay, was mixed with  $\text{CuSO}_4$  solution (4%) in the proportion of 1:50. Then 10  $\mu\text{l}$  of the supernatant and 200  $\mu\text{l}$  of BCA reagent were added to a 96 well-plate. After 30 min in the dark absorbance was measured at 570 nm. The Griess reaction is based on the Griess reagent A–0.1% naphthalenethylenediamine dihydrochloride in water and the Griess reagent B–1% sulfanilamide in 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  mixed 1:1, v/v. Mixed reagents A and B in volume 100  $\mu\text{l}$  were added to 100  $\mu\text{l}$  of the supernatant placed in 96-well plate and the optical density was determined at 540 nm.

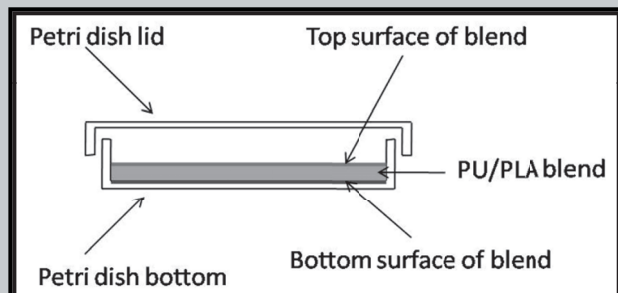
The results were expressed as average and standard deviation for three independent samples. Statistical significance was evaluated according to t-test.

Morphology of the cells was observed under fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert, Carl Zeiss, Germany). The cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 1h, then washed in PBS and stained with acridine orange solution (1mg/mL) to visualize the nucleic acids.

## Results and discussion

The PU/PLA films analyzed in this study were handled and processed with due consideration for the differences between the polymer surfaces. The surface that had been in contact with glass during casting was denoted the “bottom” surface, while the other, which had been exposed to the gas phase, a mixture of air and residual solvent vapor, was denoted the “top” surface (FIG.2).

The water contact angle measurements were carried out to evaluate the wettability of thin PU/PLA films. The water contact angle of the top surface was  $103 \pm 4^\circ$ , but for the bottom surface was about  $108 \pm 6^\circ$ , both values are significantly different at  $p < 0.01$ . This difference is due to the technique of samples preparation. When polymer is dissolved in polar



**FIG. 2.** Schematic diagram of the Petri dish used to cast the polymer films. Top denotes surface–air interface; Bottom denotes surface–glass interface.

liquid and then cast on glass trays, the water contact angle values of the top surface are expected to be lower than the bottom ones [14]. The relationship between different kind of cells and water contact angle for a variety polymer surfaces has been investigated for years. This investigations indicated that cell adhesion appears to be maximized on a surface with intermediate wettability, from  $60^\circ$  to  $90^\circ$  [15].

Another important factor which affects cell adhesion on polymer surface is its roughness. The results of profilometry measurements of PU/PLA blends are presented in TABLE 1. From the obtained results, it is noticeable that all three surface parameters ( $R_a$ ,  $R_t$ ,  $R_z$ ) are slightly lower for the top than for the bottom surface, but the results are not statisti-

**TABLE 1.** Water contact angle ( $\theta$ ) and roughness ( $R_a$ ,  $R_t$ ,  $R_z$ ) of top and bottom surface of PU/PLA films (average  $\pm$  standard deviation,  $n=10$ ).

	$\theta$ [ $^\circ\text{C}$ ]	$R_a$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_t$ [ $\mu\text{m}$ ]	$R_z$ [ $\mu\text{m}$ ]
TOP	$103 \pm 4$	$1.8 \pm 0.7$	$17.5 \pm 2.9$	$10.3 \pm 0.2$
BOTTOM	$108 \pm 6^{**}$	$2.8 \pm 0.2$	$22.1 \pm 2.5$	$16.1 \pm 1.5$

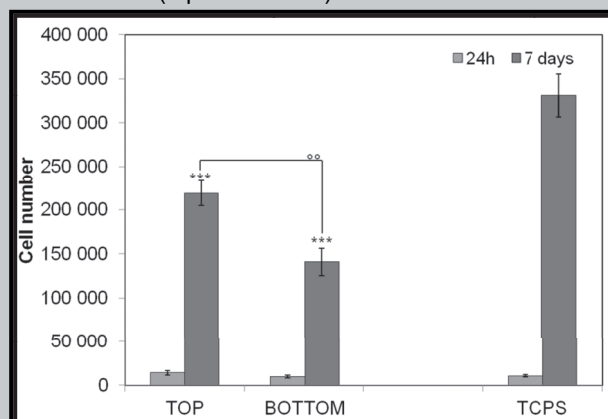
**\*\* Asterisks indicate a statistical significance between top and bottom surface:  $^{**}p < 0.01$**

cally significant.

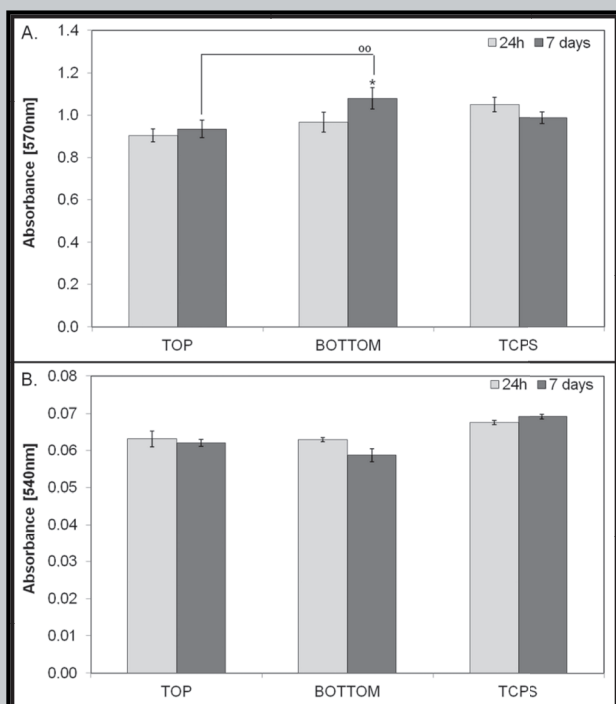
The MTT test was performed to evaluate viability of fibroblasts on PU/PLA films. One can notice that there are no significant differences after 24h of culture (FIG.3) and cell number is very similar for the top and the bottom surfaces of samples as well as for TCPS. It seems that in this case cell attachment and adhesion are independent on material surface properties. After 7 days the cells growth can be observed. However, the cell number on the top surface of PU/PLA is significantly higher than on the bottom surface. It indicated that fibroblasts adhere and proliferate more favourably on more hydrophilic and smoother surface. That fact has been also reported by other researchers [16]. Despite the fact that the highest cell number is achieved for the control material - TCPS, the PU/PLA blend still can be considered for biomedical applications.

The data from protein content are presented in FIG.4A. The total amount of proteins in supernatant after 24h is slightly lower for both the top and the bottom of PU/PLA film comparing to TCPS. After 7 days the situation has changed and higher numbers were observed for both sides of PU/PLA than for TCPS. Comparing between the top and the bottom surfaces of PU/PLA we observed that the cells, which were seeded on the bottom surface, synthesised higher amounts of protein. This can be explained by the fact that fibroblasts produce more collagen when contacting with a more hydrophobic surface [15]. The nitric oxide (NO) is a important factor in evaluating of cytotoxicity of materials, the higher content, the more cytotoxic material may be. NO level was the same for all samples as shown in FIG.4B, no statistical differences between samples were found.

Morphology and distribution of NIH 3T3 cells cultured on both surfaces (top and bottom) of the PU/PLA films as well



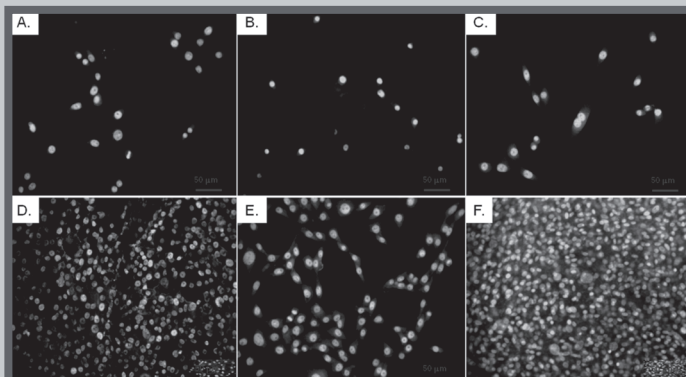
**FIG. 3.** Result of MTT test for top and bottom surfaces of PU/PLA film and for the control TCPS, after 24h and 7 days. Data are expressed as averages  $\pm$  standard deviation,  $n=3$ . Asterisks indicate a statistical significance in correspondence to the control TCPS group:  $^{***}p < 0.001$ . Circles indicate a statistical significance between the top and the bottom surface;  $^{\circ\circ}p < 0.05$ .



**FIG. 4.** Level of protein content (A.) and nitric oxide level (B.), both detected in supernatants from cell cultured for 24h and 7 days, on the top and the bottom surface of PU/PLA film and control TCPS. Data are expressed as average  $\pm$  standard deviation,  $n=3$ . Circles indicate a statistical significance between top and bottom surface; °° $p<0.05$ .

as on the reference TCPS are presented in Fig. 5. After 24 h numbers of cells is low (FIG.5 A÷C) but the cells are well spread, polygonal or spindle-shaped and their morphology is similar to that on control TCPS. After 7 days higher numbers is observed (FIG.5 D÷E). It can be seen that the number of cells on PU/PLA films is lower than on the control TCPS. The results show also that number of cells depend on film surface, and on the more rough side (bottom) cells are distributed inhomogenously and their number is significantly lower than on the smoother side (top) (FIG.5 D,E). The results obtained from fluorescent microscopy correspond well to the MTT test.

## Conclusion



**FIG. 5.** Morphology of NIH 3T3 cells cultured on the PU/PLA films: top surface (A, D), bottom surface (B, E) and reference samples TCPS (C, F) after 24h (A÷C) and 7 days (D÷F); fluorescence staining acridine orange, evaluation under fluorescence microscope.

PU/PLA films were produced by stirring the polymers in the solution. Their surface properties and their influence on cell adhesion, proliferation and secretion were evaluated. It was demonstrated that the top and the bottom surfaces show different wettability and roughness parameters. Top surface is more hydrophilic and smoother than the bottom one, therefore fibroblasts grew more likely on it. This was confirmed by the MTT tests and microscopic observations. Although, cell proliferation on the bottom surface of PU/PLA films was relatively low, the material can be considered nontoxic as confirmed by measurements the amounts of the evolved NO.

## Acknowledgement

*This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No. 2011/01/B/ST8/07426).*

## References

- [1] Gomeza N, Lub Y., Chenb S., Schmidt C.E. "Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture" *Biomaterials* Volume 28, Issue 2, January 2007, pp 271-284.
- [2] Shin H., Jo S., Mikos A.G. "Biomimetic materials for tissue engineering" *Biomaterials*, 24 (24) (2003), pp. 4353-4364.
- [3] Drotleff S., Lungwitz U., Breunig M., Dennis A., Blunk T., Tesmar J. "Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences" *Eur J Pharm Biopharm*, 58 (2) (2004), pp. 385-407
- [4] Kasemo B. "Biological surface science" *Surf Sci*, 500 (1-3) (2002), pp. 656-677.
- [5] Y. Ito Tissue engineering by immobilized growth factors *Mater Sci Eng C*, (6) (1998), pp. 267-274.
- [6] Schmidt CE, Leach JB. "Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration" *Annual Rev Biomed Eng* 2003 (5) 293-347.
- [7] Eric C. Spivey, Zin Z. Khaing, Jason B. Shear, Christine E. Schmidt "The fundamental role of subcellular topography in peripheral nerve repair therapies" *Biomaterials* 33 (2012) 4264-4276
- [8] P. Roach, T. Parker, N. Gadegaard, M.R. Alexander "Surface strategies for control of neuronal cell adhesion: A review" *Surface Science Reports* 65 (2010) 145-173.
- [9] Ma Z., Mao Z., Gao C. "Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60 (2007) pp137-157.
- [10] Vadgama P. "Surfaces and interfaces for biomaterials: Surface interaction and in vitro studies - Interaction between biomaterials and cell tissues" *CRC Press* 2005.
- [11] Gupta A.P., Kumar V. "New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide: A critique" *Eur Pol J* 43 (2007) 4053-4074.
- [12] Nair L.S., Laurencin C.T. "Biodegradable polymers as biomaterials" *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762-798.
- [13] Gorna K, Gogolewski S. "Molecular stability, mechanical properties, surface characteristics and sterility of biodegradable polyurethanes treated with low-temperature plasma" *Polymer Degradation and Stability* 79 (2003) 475-485.
- [14] Tang Z.G., Black R.A., Curran J.M., Hunt J.A., Rhodes N.P., Williams D.F. "Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ε-caprolactone] films" *Biomaterials* 25 (2004) 4741-4748.
- [15] Saltzman W. Mark "Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues - Cell interactions with polymer surfaces" *Oxford University Press* 2004 pp 224-227.
- [16] Ellingsen J. E., Lyngstadaas S. P. "Bio-implant interfaces: Improving Biomaterials and Tissue Reactions - Improving the Bio-Implant Interface by Controlling Cell Behavior Using Surface Topography" *CRC Press* 2003 pp 106-108.

## PERSONALIZED MEDICINE



# USING POLYMERS: UTOPIA OR REALITY?

PETER DUBRUEL<sup>1\*</sup>, TIM DESMET<sup>1</sup>, SANDRA VAN VLIERBERGHE<sup>1</sup>,  
OLGA MUSIAL<sup>1</sup>, RIA CORNELISSEN<sup>2</sup>, HEIDI DECLERCQ<sup>2</sup>,  
ELKE BERNEEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS RESEARCH GROUP,  
GHENT UNIVERSITY,

KRIJGSLAAN 281 (S4), B-9000 GHENT, BELGIUM.

<sup>2</sup>TISSUE ENGINEERING GROUP, GHENT UNIVERSITY,

DE PINTELAAN 185, B-9000 GHENT, BELGIUM

MAILTO: PETER.DUBRUEL@UGENT.BE

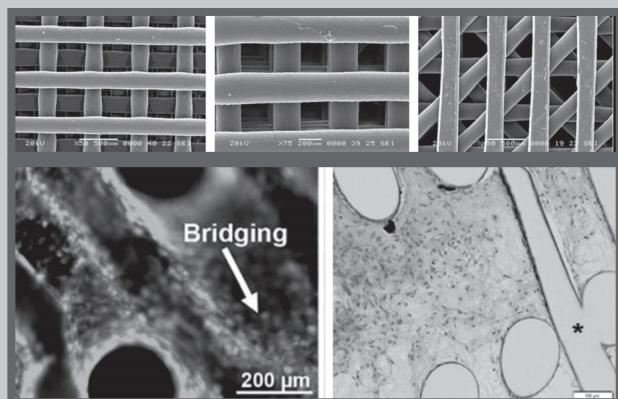
[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 123]

## Introduction

Medicine has witnessed several revolutions in the last decade. New therapies as well as new drugs have been implemented in the medical practice at a high pace. One revolution witnessed includes the application of patient specific implants. The concept is straightforward. When a certain organ or part of it is malfunctioning, a medical imaging technique is applied to map the defect and its extent. Using an automated CAD CAM approach (Computer Aided Design - Computer Aided Manufacturing), a perfect copy of the original defect can be produced. In our laboratories, we have applied FDA approved poly-ε-caprolactone (PCL) as starting material for the production of 3D porous materials using the Bioplotter™ as rapid prototyping technique.

## Materials and methods

From previous research on 2D PCL ( $M_w=80\text{KDa}$ , bio-medical grade) spincoated on glass slides, it was evident that native PCL did not possess cell-interactive properties (towards osteosarcoma cells) while being non-toxic to cells. [1] To overcome this key limitation, a multi-step modification strategy compatible with 3D porous materials was elaborated on in the present work. The procedure was comprised of (1) a plasma treatment to introduce surface (hydro)peroxides, (2) the radical grafting of 2-aminoethyl-methacrylate to introduce functional anchoring groups, (3) the bioconjugation of gelatin as biopolymer prime layer and (4) the application of a top layer (fibronectin, ...) to fine-tune the biological properties. [1-3] The method was applied on 3D scaffolds fabricated with different lay-down patterns : 0/90°, 0/45° and 0/90° shifted pattern (0/90° S). To visualize cell adhesion and colonization on the scaffolds by MC3T3-E1 cells (mouse calvaria preosteoblast cells, ATCC), cell/scaffold constructs were evaluated using inverted contrast light and fluorescence microscopy (calcein AM stained cells)



at various time points after cell seeding (750 000 cells/ 40 μl/47.71 mm<sup>3</sup> scaffold). The following parameters were quantified for the different scaffolds developed: cell seeding efficiency, cell adhesion, - proliferation, - colonization and - differentiation.

## Results and discussion

The in vitro cell culture tests on the 3D scaffolds developed (see top figure aside) revealed a good cell adhesion on and infiltration throughout the entire 3D structure (see bottom figure aside for representative fluorescence and optical microscopy images). Very interestingly, we were able to show that at least for the developed double protein coated PCL scaffolds, the scaffold coating overrules the scaffold design in terms of its osteogenic potential. During the presentation, quantitative data for various cell related phenomena (adhesion, colonization, differentiation) will be presented as well as the mechanisms and/or reasons underlying the observed findings.

## Conclusions

In conclusion, we have applied PCL as an exemplifying case to proof the feasibility of seamlessly merging three key technologies with the aim to increase the human quality of life: (1) polymer (processing) technology, (2) polymer surface technology and (3) cell technology.

## Acknowledgement

*The authors would like to acknowledge the FWO and UGent for financial support of the work performed. Dr. Sandra Van Vlierberghe is a post-doctoral fellow of the FWO (Fund for Scientific research Flanders).*

## References

- [1] Desmet et al., *Macromolecular Bioscience* 2010, 10, (12), 1484-1494.
- [2] Desmet et al., *J Mater Sci: Mater Med* (2012) 23:293-305.
- [3] Berneel et al., *J Biomed Mater Res Part A* 2012;100A:1783-1791.

POROUS PLURONIC-BASED

## SCAFFOLDS: AN ATTRACTIVE CONCEPT TOWARDS TISSUE REGENERATION

MIEKE VANDENHAUTE<sup>1</sup>, ELIEN GEVAERT<sup>2</sup>, RIA CORNELISSEN<sup>2</sup>,  
CATHERINE VERFAILLIE<sup>3</sup> AND PETER DUBRUEL<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS RESEARCH GROUP,  
GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 (S4), B-9000 GHENT,

<sup>2</sup>DEPARTMENT BASIC MEDICAL SCIENCES,  
FACULTY OF MEDICINE, GHENT UNIVERSITY, BELGIUM,

<sup>3</sup>INTERDEPARTMENTAL STEM CELL INSTITUTE,  
KULEUVEN, BELGIUM.

MAILTO: PETER.DUBRUEL@UGENT.BE

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 124-125]

### Introduction

The maintenance of functional cells in vitro and in vivo is an important topic of investigation [1]. In the presentwork, hydrogels composed of Pluronic® F127 derivatives (PEO-PPO-PEO) are investigated as possible HepG2cell matrices to assess their applicability for tissue engineering purposes. To enable the production of complexthree-dimensional and fully interconnected scaffolds starting from CAD data, the Bioplotter™ technology has been applied. In the present work, recent developments are presented on the fabrication of covalentlycrosslinked 3D scaffolds using two strategies including UV-photopolymerisation and a biosynthetic enzymatic pathway.

### Materials and methods

Polymerizable Pluronic® F127 derivatives were ob-

ing of the Pluronic® derivatives (F127-E1 and F127-E2). The derivatives developed have been characterized using 1H-NMR and FTIR spectroscopy. Aqueous solutions have been prepared and hydrogel sheets were developed using UV-curing (in the presence of 2 mol% Irgacure® 2959 as photoinitiator) or enzymatic crosslinking. The hydrogels developed were characterized for their sol/gel fractions, temperature-dependent swelling properties, degradation and mechanical properties. For the fabrication of 3D polymer scaffolds, 30% (w/w) aqueous solutions were applied. The 3D construction of the scaffolds occurred in a laminar fashion by a computer-controlled deposition of the material [3]. After the plotting step, the crosslinking of the end-groups was performed as indicated above. The scaffolds developed were characterized using optical microscopy and SEM. The hydrogels were applied as encapsulation matrices for HepG2 cells. Cell viability studies were performed using Calcein AM/PI staining.

### Results and discussion

The FTIR and 1H-NMR spectra indicated that the Pluronic® derivatives were successfully synthesized, showing a high degree of substitution (>90%) as required for both the photo-polymerization as well as for the enzymatic crosslinking. Interestingly, enzymatic crosslinking results in a shorter gelation time compared to the photocrosslinking, even at lower Pluronic® concentrations. The hydrogels developed were characterized in depth and were suitable to be applied as starting materials to fabricate 3D scaffolds using the Bioplotting™ process (see FIG.1). Preliminary biocompatibility and cell viability studies using HepG2 (see FIG.2) indicated that the functionalization strategy elaborated and applied showed a significant effect on the cell viability of HepG2 cells.

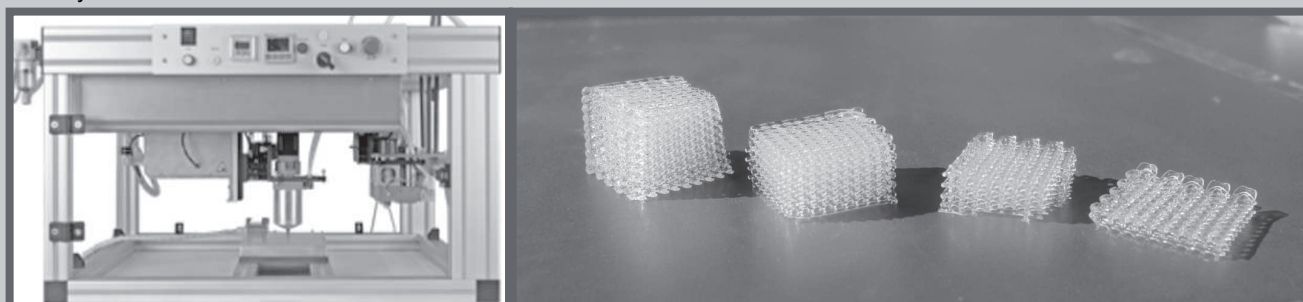


FIG. 1. 3D scaffolds based on Pluronic® F127-UV1, fabricated by the Bioplotting™ process (left: Bioplotter, right: hydrated samples with respectively 20 and 15 layers).

tained via the modification of the terminal hydroxyl functionalities [2]. For the synthesis of UV-photopolymerizable Pluronic® F127-UV1 and F127-UV2, methacryloyl chloride was applied, introducing photocrosslinkable methacrylate end-groups with (F127-UV2) and without (F127-UV1) a spacer. For the bio-inspired enzymatic pathway, dedicated end-groups were introduced. This enabled a biosynthetic reaction, resulting in crosslink-

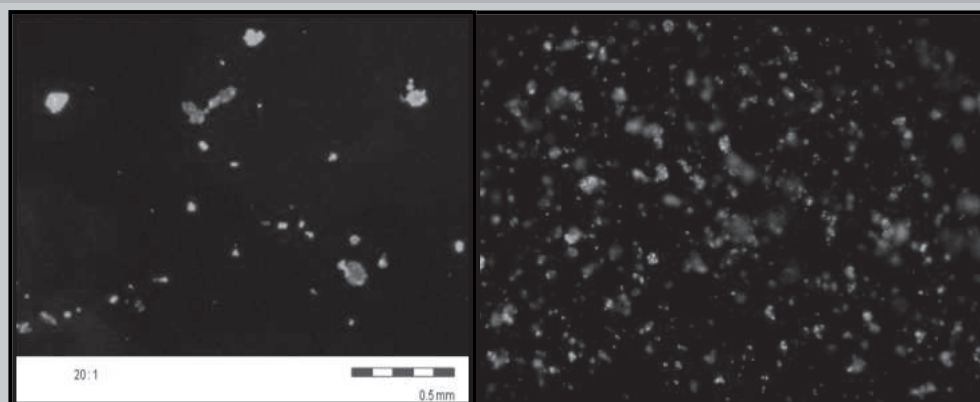


FIG. 2. Preliminary cell viability test of HepG2 cells encapsulated in F127-UV2 (left) and F127-E1 (right), using a Calcein AM/Propidium iodide staining.

## Conclusions

The results indicate that 3D scaffolds can be successfully developed starting from various Pluronic® F127 derivatives and by applying different crosslinking strategies. At present, the potential of the scaffolds developed to function as cell carriers is further evaluated (gene expression studies,...). The results will be presented at the meeting. Future work will focus on the fine-tuning of the degradation behaviour and biocompatibility as well as on the 3D Bioplotting of hydrogels containing encapsulated cells.

## Acknowledgement

*The authors would like to acknowledge the research Foundation Flanders (FWO-Flanders) and the IWT (Agency for Innovation by Science and Technology, Belgium, IWT-SBO HEPSTEM project) for financial support.*

## References

- [1] S.Kazemnejad, Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 1(3):135-145, 2009.
- [2] Sosnik, A., Cohn, D., Román, J.S. and Abraham, G.A. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edn, 14(3):227-239, 2003.
- [3] Billiet T., Vandenhoute M., Schelfhout J., Van Vlierberghe S. and Dubrue P., Biomaterials 2012, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.050.

## GELATIN AS A VERSATILE HYDROGEL BUILDING BLOCK: ONE POLYMER, MANY APPLICATIONS

OLGA MUSIAL<sup>1</sup>, SANDRA VAN VLIERBERGHE<sup>1</sup>, THOMAS BILLIET<sup>1</sup>, FRANCISCA FERREIRA<sup>1</sup>, ELS VANDERLEYDEN<sup>1</sup>, RIA CORNELISSEN<sup>2</sup>, HEIDI DECLERQ<sup>2</sup>, JAN SCHROOTEN<sup>3</sup>, RON UNGER<sup>4</sup>, JAMES KIRKPATRICK<sup>4</sup>, PETER DUBRUEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS GROUP, GHENT UNIVERSITY, BELGIUM;

<sup>2</sup>TISSUE ENGINEERING GROUP, GHENT UNIVERSITY, BELGIUM;

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF METALLURGY AND MATERIALS ENGINEERING (MTM) AFDELING FYSISCHE MATERIAALKUNDE, KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN;

<sup>4</sup>INSTITUTE OF PATHOLOGY, UNIVERSITY MEDICAL CENTER, JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, GERMANY

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 125-126]

## Introduction

Mankind has always been confronted with failing tissues and organs. As a consequence, medicine has tried to offer solutions for conditions which might, in some cases, be life threatening. Throughout the years, nature-inspired biomaterials have been one of the approaches which have been deemed useful.

In our laboratories at Ghent University, we have initiated in 2006 a large research platform in which gelatin and its derivatives are screened for a large variety of biomaterial applications. In collaboration with various national and international research groups, we have been developing and studying porous gelatin or gelatin-coated scaffolds as cell carriers.

## Results and discussion

Due to the solubility of gelatin at physiological conditions, a strategy has been elaborated to chemically functionalize part of the gelatin amino acids with cross-linkable groups enabling permanent cross-linking (FIGURE 1).

While the first generation scaffolds were developed using a cryogenic treatment of permanently cross-linked gelatin-methacrylamide, technological capabilities have significantly evolved. This has among other resulted in the development of perfectly interconnecting scaffolds using the Bioscaffolder technology. Starting from a scan of a part of the human body,

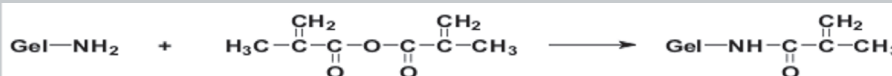


FIG. 1. Chemical modification of gelatin amine functions using methacrylic anhydride leading to a permanently cross-linkable gelatin derivative.

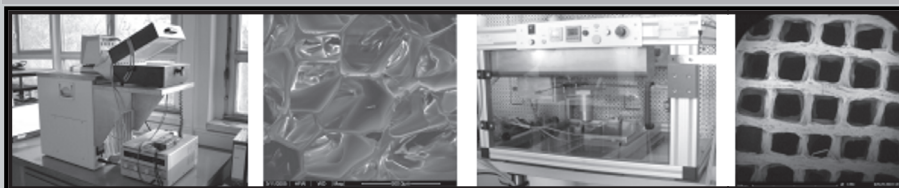


FIG. 2. From left to right: Cryogenic Unit (CU), gelatin scaffold produced using CU, Bioplotter Unit (BU), gelatin scaffold produced using BU.



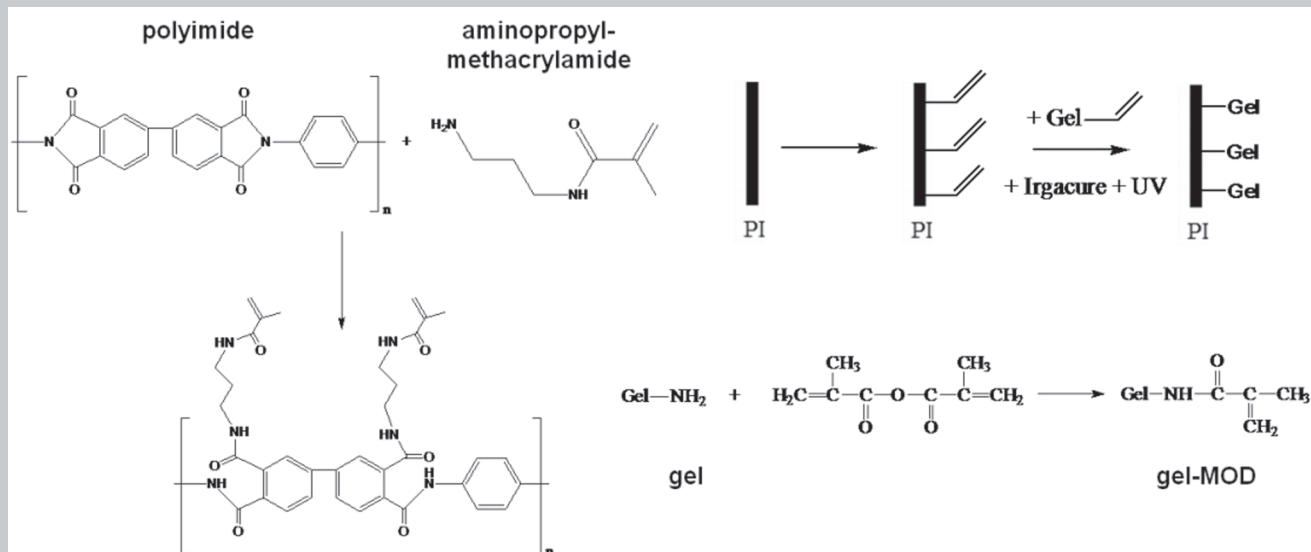


FIG. 3. Concept of gelatin coated polyimide implants for treating age related macular degeneration (ARMD).

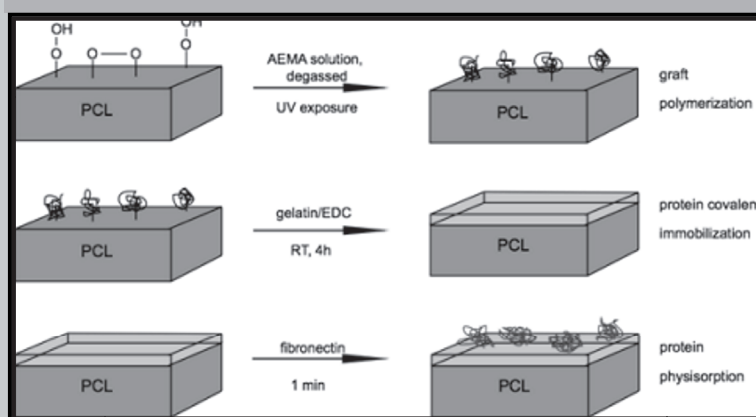


FIG. 4. Concept of immobilizing gelatin on poly-ε-caprolactone surfaces to be applied as meniscus implant.

the technology enables the production of patient specific implants. A comparison between the capabilities of both techniques is illustrated in the figure below.

In addition to applying gelatin as such, an overview will also be given of a variety of applications in which we have developed gelatin hydrogel coated implant materials. Examples range from ocular to orthopaedic applications.

In a first approach, gelatin has been covalently immobilized on polyimide implants with the aim to treat age related macular degeneration (FIGURE 3).

The latter application has enabled the development of gelatin coated meniscus (FIGURE 4) and titanium implants.

The presentation will cover for each of these applications: (1) the development of the hydrogel building blocks, (2) their processing into 3D scaffolds or implant coatings and (3) the biological evaluation of the obtained materials.

## Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the following funding agencies: Alexander Von Humboldt Foundation, EU (FP6 PolExGene project, contract number 019114), IWT (SBO project HEPSTEM, contract number 990066), FWO and UGent (BOF project 2009-2013: Production of porous polymer structures via Bioplotting for cardiovascular applications).

# THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND PORE SIZE ON CELL GROWTH AND PROLIFERATION ON HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS

DALIBOR SOUKUP<sup>1</sup>, MARKETA BACAKOVA<sup>1</sup>, WILLI PABST<sup>2</sup>,  
EVA GREGOROVA<sup>2</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND TISSUE ENGINEERING,  
INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH  
REPUBLIC,  
VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF GLASS AND CERAMICS,  
INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY IN PRAGUE,  
TECHNICKA 5, 166 28 PRAGUE 6-DEJVICE, CZECH REPUBLIC

## Abstract

Porous biomaterials, especially synthetic porous ceramics, are of significant importance in bone tissue engineering, and there has been rapid growth in the medical use of these biomaterials over the last 50 years. The reason is that they are relatively easy to prepare and are available in unlimited supply, unlike the allografts and autografts that are used in clinical practice. Various hydroxyapatite (HAp) scaffolds can be prepared, using various pore-forming techniques and firing temperatures. The firing temperature significantly affects microstructural parameters such as total porosity, pore size, the interconnected pore network, and also the chemical and phase composition. Last but not least, it also affects the mechanical properties of the samples. Knowledge about these factors is therefore essential for designing a sample with the desired controlled microstructure and properties.

In this work, uniaxial pressing has been used for preparing HAp disks from nanocrystalline HAp powder, using saccharose as a pore-forming agent. The highest porosity achieved (after partial sintering at 800°C) was in the range of 64.7-70.6%. The firing temperature significantly affects porosity, pore size, grain size and mechanical strength, whereas the dwell time has only a minor effect on these parameters. After firing, XRD confirmed more than 98.4% HAp in all cases. Mercury porosimetry confirmed the presence of nanosized interstitial voids for partially sintered materials and pore throat sizes of approximately 100µm (much smaller than the pore cavities), which is adequate for bone cell penetration and further ingrowth. After firing at 1200°C, the matrix is more or less fully sintered, and nanosized pores are absent or closed.

The biological part of the paper summarizes the results from cell-seeding and cultivation experiments to determine the cell adhesion, proliferation, viability, mitochondrial activity and osteogenic cell differentiation on the scaffolds, and thus the biocompatibility and bioactivity of the scaffolds. The highest values for all these parameters, particularly the number of cells, were on HAp fired at 1200°C. The samples fired at 1200°C were prepared with various pore sizes (in the range of 100 – 800µm). We found that pore size has a non-significant effect on cell colonization, whereas the firing temperature has a major influence. All tested HAp samples showed a remarkable ability to adsorb

proteins on their surfaces, namely albumin and fibronectin, and to promote cell adhesion. Some cytotoxic activity was observed on the samples fired at 800 and 1000°C. Possible reasons for this cytotoxicity have been discussed. However, it can be concluded that the HAp samples created in this study and fired at 1200°C hold great promise for bone tissue engineering.

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 127

## Acknowledgements

Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 106/09/1000) and the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (grant No. FR-TI3/088).

# POLYLACTIDE NANOFIBERS IN SKIN TISSUE ENGINEERING

MARKETA BACAKOVA<sup>1</sup>, MARIAN VARGA<sup>2</sup>, TOMAS RIEDEL<sup>3</sup>,  
DENISA STRANSKA<sup>4</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,  
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,  
VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4 – KRC,

<sup>2</sup>INSTITUTE OF PHYSICS,  
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,  
CUKROVARNICKA 10, CZ-16253 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC

<sup>3</sup>INSTITUTE OF MACROMOLECULAR CHEMISTRY,  
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,  
HEYROVSKY SQ. 2, 16206 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC

<sup>4</sup>ELMARCO LTD., V HORKACH 76/18, 460 07 LIBEREC, CZECH  
REPUBLIC

MAILTO: MARKETA.BACAKOVA@BIOMED.CAS.CZ

## Abstract

Various artificial or natural biomaterials can be used for constructing a scaffold suitable for treating skin injuries. Artificial skin replacements are made from polyhema, polybutylene terephthalate, nylon, polylactic acid and polyglycolic acid or their copolymers. The most widely applied natural biomaterials are collagen, chitin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate [1]. In recent tissue engineering, nanofibrous scaffolds have been very attractive because they better simulate the architecture of natural extracellular matrix. In skin tissue engineering, nanofibrous membranes can be used for constructing a bilayer of fibroblasts and keratinocytes [2]. These membranes will separate the two cell types, ensuring their physical and humoral communication; thus the layer of fibroblasts will serve as a feeder for keratinocytes. For our study, we chose nanofibers made of polylactide (PLA), prepared in external collaboration with Elmarco Ltd. (Liberec, Czech Republic). The main advantage of PLA is its biodegradability; it is slowly resorbed in the organism, and is finally replaced by regenerate tissue.

The adhesion and growth of cells on the scaffolds can be improved by further modifications, e.g. plasma treatment or coating the scaffold fibers with biomolecules that are normally present in the natural skin (collagen, hyaluronic acid), or that occur during wound healing (fibrin). Modification by plasma leads to changes in the physical and chemical properties of the material surface (i.e., surface wettability, morphology, electric conductivity, roughness, morphology, mechanical properties) [3].

In our experiment we evaluated the interaction of human HaCaT keratinocytes with PLA nanofibrous meshes that were modified by plasma irradiation or by coating with collagen, fibrin and hyaluronan of low (70-120 kDa) or high (1000-1250 kDa) molecular weight. For plasma irradiation, PLA nanofibers were exposed to O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> or Ar plasma for different times, with various ranges of power. For more detailed studies, O<sub>2</sub> plasma was chosen, because this type of plasma best supported the adhesion and growth of cells. PLA nanofibrous meshes were prepared with different densities of the fibres (5 g/m<sup>2</sup>, 9 g/m<sup>2</sup>, 16 g/m<sup>2</sup>, 30 g/m<sup>2</sup>). The potential damage to the fibres after plasma modification was observed using scanning electron microscopy (SEM). The cell adhesion, growth and metabolic activity were evaluated by the number of cells, their morphology, the amount of cellular DNA (PicoGreen ds DNA assay kit, Invitrogen®) and the XTT test (Roche) on days 1, 3 and 7 after seeding.

The results indicated that polylactide nanofibrous scaffolds promote adhesion and growth of HaCaT keratinocytes. Modification in plasma further improved the proliferation of cells on PLA nanofibers. The cells proliferated better on PLA meshes with lower densities of the fibers (5 g/m<sup>2</sup>, 9 g/m<sup>2</sup>). SEM showed that damage to the fibers increased with the length of the period of plasma treatment. The collagen deposited on the fibers changed the morphology of the cells. The cells on the control unmodified fibers adhered in clusters, but on the collagen-coated fibers they were spread homogeneously. We can conclude that polylactide nanofibrous membranes are a promising material for the construction of temporary carriers for skin cells, particularly after they have been physically or biologically modified.

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 127-128]

## Acknowledgements

Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grants No. P108/10/1106, P108/12/1168 and P108/12/G108). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague, Czech Republic) is gratefully acknowledged for his language revision of the abstract.

## References

- [1] Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, Germain L, Kinikoglu B, Bechettille N, Braye F, Auger FA, Damour O. *Eur J Dermatol* 19 (2): 107-113, 2009.
- [2] Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2 (5): 510-525, 2010.
- [3] Bačáková L, Švorčík V. In: *Cell Growth Processes: New Research* (Ed. Daiki Kimura), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York, USA; pp 5-56, 2008.

# APPLICATION OF CELLULOSE-BASED BIOMATERIALS IN VASCULAR TISSUE ENGINEERING – A REVIEW AND OUR EXPERIENCE

LUCIE BACAČOVÁ<sup>1\*</sup>, KATARINA NOVOTNÁ<sup>1</sup>, MARTIN PARIZEK<sup>1</sup>, PAVEL HAVELKA<sup>2</sup>, TOMAS SOPUCH<sup>3</sup>

<sup>1</sup>DEPT. OF BIOMATERIALS AND TISSUE ENGINEERING, INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, VIDENSKÁ 1083, 14220 PRAGUE 4 – KRC, CZECH REPUBLIC;

<sup>2</sup>VUOS A.S., RYBITVI 296, 533 54 RYBITVI, CZECH REPUBLIC

<sup>3</sup>SBU NITROCELULOZA, SYNTHESIA A.S., PARDUBICE-SEMTIN, CZECH REPUBLIC

\*MAILTO: LUCY@BIOMED.CAS.CZ

## Abstract

Artificial vascular replacements used in current clinical practice are fabricated from polyethylene terephthalate (PET, e.g. Dacron) or polytetrafluoroethylene (PTFE, e.g. Teflon). Older materials used earlier for constructing vascular prostheses are polyamide (Nylon), polyvinyl alcohol (Ivalon) and polyacrylonitrile (Orlon). New promising materials include polyurethane and a wide range of biodegradable synthetic or nature-derived polymers, which are usually designed as temporary scaffolds for vascular cells forming a new regenerated blood vessel wall (for a review, see [1]). One of the nature-derived polymers is cellulose and its derivatives and composites with other materials.

Cellulose is the most abundant biopolymer on Earth. It is a polysaccharide consisting of a linear chain of several hundred to over ten thousand β(1→4) linked D-glucose units [2,3]. Cellulose is the structural component of the primary cell wall of green plants, many forms of algae and the oomycetes. In plant cells, cellulose microfibrils are synthesized at the plasma membrane by hexameric protein complexes, also known as cellulose synthase complexes [4]. Some species of bacteria secrete cellulose to form biofilms.

For industrial use, cellulose is mainly obtained from wood pulp and cotton. For tissue engineering applications, bacterial cellulose has been predominantly used, mainly that synthesized by *Acetobacter xylinum*. Bacterial cellulose is identical to plant cellulose in chemical structure, but it can be produced without contaminant molecules, such as lignin and hemicelluloses, and does not require intensive purification processes. In addition, it is remarkable for its mechanical strength, its ability to be engineered structurally and chemically at nano-, micro-, and macroscales, its biocompatibility and chemical and morphologic controllability [5]. Bacterial cellulose has been used for experimental engineering of bone tissue [6], cartilage [7], skin [8], heart valve [9], and also for urinary reconstruction and diversion [10].

One of the first attempts at vascular tissue engineering was made with cellulose fibers, which were used for constructing three-dimensional vascularized tissue *in vitro*. These fibers were immobilized with fibronectin in order to improve cell adhesion, and were seeded with bovine coronary artery smooth muscle cells.



These cells proliferated on the scaffolds and, after they formed multilayers on the fibers, the fibers were removed by enzymatic digestion using cellulase. The remaining smooth muscle cell aggregates maintained lumens after this procedure, and thus mimicked newly-formed blood vessels [11]. Similarly, three-dimensional nanofibrous scaffolds with micropores made of bacterial cellulose allowed attachment and proliferation of human saphenous vein smooth muscle cells on the surface and also in the inside of the scaffolds [12]. In addition, the mechanical properties of nanofibrous bacterial cellulose scaffolds, evaluated by the shape of the stress-strain response, were reminiscent of the properties of the carotid artery, most probably due to the similarity in architecture of the nanofibril network [13].

The adhesion and growth of vascular endothelial cells was also supported by cellulose-based scaffolds, namely by nanofibrous bacterial cellulose or cellulose acetate scaffolds, especially if these scaffolds were functionalized with RGD-containing oligopeptides, i.e. ligands for integrin adhesion receptors on cells [14, 15], or if they were combined with chitosan [16]. The angiogenic response to bacterial cellulose was also observed under in vivo conditions, i.e. after implantation of these scaffolds in the form of dorsal skinfold chambers into Syrian golden hamsters [17].

Cellulose has also been used for creating tubular structures designed for replacing small-caliber vessels. Hollow-shaped segments of bacterial cellulose were created with a length of 10 mm, an inner diameter of 3.0–3.7 mm and a wall thickness of 0.6–1.0 mm. These grafts were used to replace the carotid arteries of eight pigs. After a follow-up period of 3 months, seven grafts (87.5%) remained patent, whereas one graft was found to be occluded. All patent grafts developed a single inner layer of endothelium with a basement membrane and a thin layer of collagen, followed by a concentric medial layer containing smooth muscle cells and cellulose, and an outer layer of fibrous cells [18].

Similarly, bacterial cellulose grafts 4 cm in length and 4 mm in internal diameter were implanted bilaterally in the carotid arteries of eight sheep. Although 50% of the grafts occluded within 2 weeks, all patent grafts developed a confluent inner layer of endothelial-like cells [19]. In addition, the mechanical properties of tubular structures created from bacterial cellulose seemed to be advantageous for vascular tissue engineering. For example, these structures exhibited a compliance response similar to that of human saphenous vein [20].

In our experiments, we have concentrated on cellulose-based materials modified with oxidation and/or functionalization with biomolecules. We have prepared fibrous scaffolds made of non-oxidized viscose, dialdehyde cellulose and 6-carboxycellulose with 2.1 wt.% or 6.6 wt.% of –COOH groups. In addition, all these material types were functionalized with arginine, i.e. an amino acid with a basic side chain, or with chitosan, in order to balance (compensate) the relatively acid character of oxidized cellulose molecules. Two groups of samples with and without functionalization were then seeded with vascular smooth muscle cells (VSMC) derived from the rat thoracic aorta by an explantation method [21].

We found that the oxidized cellulose with 2.1 wt.% of –COOH groups was the most appropriate of all the tested materials for colonization with VSMC. The cells

on this material achieved an elongated shape, while they were spherical in shape on the other materials. In addition, the numbers of cells obtained in one week after seeding and the concentration of alpha-actin and SM1 and SM2 myosins, measured per mg of protein, were significantly higher on oxidized cellulose with 2.1 wt.% of –COOH groups. Functionalization with arginine and chitosan improved the cell adhesion, but usually only slightly. The most apparent increase in cell number after functionalization was observed on oxidized cellulose with 2.1 wt.% of –COOH groups functionalized with chitosan, and on viscose functionalized with chitosan or arginine. However, the cells on all samples proliferated slowly and with a non-significant increase in cell population densities from day 1 to 7 after seeding. This suggests that cellulose-based materials can be used in applications where high proliferation activity of vascular smooth muscle cells is not desirable. They can therefore be used on vascular prostheses, where excessive VSMC proliferation can lead to the restenosis of the graft. Alternatively, cell proliferation might be enhanced by some other more efficient modification. This would require further research.

**[Engineering of Biomaterials, 116–117, (2012), 128–130]**

## References

- [1] Chlupac J, Filova E, Bacakova L: *Physiol Res* 58 Suppl 2: S119–139, 2009.
- [2] Mutwil M, Debolt S, Persson S: *Curr Opin Plant Biol* 11: 252–257, 2008.
- [3] Pooyan P, Tannenbaum R, Garmestani H: *J Mech Behav Biomed Mater* 7: 50–59, 2012.
- [4] Gu Y, Somerville C: *Plant Signal Behav* 5: 1571–1574, 2010.
- [5] Petersen N, Gatenholm P: *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 1277–1286, 2011.
- [6] Zaborowska M, Bodin A, Bäckdahl H, Popp J, Goldstein A, Gatenholm P: *Acta Biomater* 6: 2540–2547, 2010.
- [7] Andersson J, Stenhamre H, Bäckdahl H, Gatenholm P: *J Biomed Mater Res A* 94: 1124–1132, 2010.
- [8] Kingkaew J, Jatupaiboon N, Sanchavanakit N, Pavasant P, Phisalaphong M: *J Biomater Sci Polym Ed* 21: 1009–1021, 2010.
- [9] Mohammadi H: *Proc Inst Mech Eng H* 225: 718–722, 2011.
- [10] Bodin A, Bharadwaj S, Wu S, Gatenholm P, Atala A, Zhang Y: *Biomaterials* 31: 8889–8901, 2010.
- [11] Ko IK, Iwata H: *Ann N Y Acad Sci* 944: 443–455, 2001.
- [12] Bäckdahl H, Esguerra M, Delbro D, Risberg B, Gatenholm P: *J Tissue Eng Regen Med* 2: 320–330, 2008.
- [13] Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P: *Biomaterials* 27: 2141–2149, 2006.
- [14] Bodin A, Ahrenstedt L, Fink H, Brumer H, Risberg B, Gatenholm P: *Biomacromolecules* 8: 3697–3704, 2007.
- [15] Fink H, Ahrenstedt L, Bodin A, Brumer H, Gatenholm P, Krettek A, Risberg B: *J Tissue Eng Regen Med* 5: 454–463, 2011.
- [16] Rubenstein D, Han D, Goldgraben S, El-Gendi H, Gouma PI, Frame MD: *Microcirculation* 14: 723–737, 2007.
- [17] Esguerra M, Fink H, Laschke MW, Jeppsson A, Delbro D, Gatenholm P, Menger MD, Risberg B: *J Biomed Mater Res A* 93: 140–149, 2010.
- [18] Wippermann J, Schumann D, Klemm D, Kosmehl H, Salehi-Gelani S, Wahlers T: *Eur J Vasc Endovasc Surg* 37: 592–596, 2009.
- [19] Malm CJ, Risberg B, Bodin A, Bäckdahl H, Johansson BR, Gatenholm P, Jeppsson A: *Scand Cardiovasc J* 46: 57–62, 2012.
- [20] Zahedmanesh H, Mackle JN, Sellborn A, Drotz K, Bodin A, Gatenholm P, Lally C: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 97: 105–113, 2011.
- [21] Bacakova L, Lisa V, Pellicciari C, Mares V, Bottone MG, Kourek F: *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33: 410–413, 1997.

Supported by the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (grant No. 2A-1TP1/073) and by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 305/08/0108). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague, Czech Republic) is gratefully acknowledged for his language revision of the text.

## POTENTIAL ACTIVATION OF THE IMMUNE SYSTEM ON METALLIC MATERIALS FOR BONE IMPLANTS

LUCIA STRANAVOVA<sup>1</sup>, MARKETA BACAKOVA<sup>1</sup>,  
KATARINA NOVOTNA<sup>1</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>, JAROSLAV FENC<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,  
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,  
VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup>BEZNOSKA LTD., DELNICKA 2727, 272 01 Kladno 2 – KROCEHLAVY, CZECH REPUBLIC

Titanium and stainless steel are metallic materials that have been in use for a long time in orthopedics, traumatology and stomatology. These metals are strong, corrosion-resistant and biocompatible. However, metallic materials have some disadvantages in comparison with the natural bone, particularly their relatively high specific weight and toughness. For example, the Young's modulus of AISI 316L stainless steel, Co-Cr alloys and Ti-6Al-4V alloy, i.e. materials frequently used for implantation into bone, ranges between 110-220 GPa, while the Young's modulus of bone tissue is 10-40 GPa [1]. In addition, these metals can release cytotoxic, allergenic and immunogenic ions, which can affect their biocompatibility [2, 3]. Implantation is a special type of transplantation process, in which the implant is inserted into the body, usually in order to replace an irreversibly damaged tissue. However, the immune system recognizes the implant as a foreign substance and attacks it with its effector mechanisms. Just as it can reject other types of transplants, the immune system can reject an artificial implant. To prevent rejection of an implant, it is important to study the potential activation of the immune system.

This study has investigated the biocompatibility of samples made of pure titanium (according to quality standard ISO 5832-2) and corrosion-resistant steel (quality standards ISO 5832-1 and AISI 316L), obtained from Beznoska Ltd. (Kladno, Czech Republic), and the potential activation of the immune system by these materials. In addition to Fe, the steel samples contained C (max. 0.025 wt.%), Si (0.6 wt.%), Mn (1.7 wt.%), P (max. 0.025 wt.%), S (max. 0.003 wt.%),

Cr (17.5 wt.%), Ni (13.5 wt.%), Mo (2.8 wt.%), and Cu (max. 0.1 wt.%). The materials were used in the form of square samples (9x9 mm or 30x30 mm, thickness 1 mm). Both the Ti samples and the steel samples were ground with SiO<sub>2</sub>. The surface of the steel samples was then treated by polishing with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> paste (grain size up to 1 µm), while the surface of the Ti samples, i.e. a material not suitable for polishing, was finished by brushing using another type of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> paste with slightly larger grains. Thus, the surface of the steel samples was finally smoother and glossy, while the Ti surface was rougher and matte.

For the *in vitro* biocompatibility tests, human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were used. The smaller samples (9x9 mm) were inserted into polystyrene 24-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland; well diameter 1.5 cm). Each well contained 25 000 cells (approx. 14 150 cells/cm<sup>2</sup>) and 1.5 ml of Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, USA, Cat. No. 10270-106) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco, Cat. No. 10270-106) and gentamicin (40 µg/ml, LEK, Slovenia). These samples were used for evaluating the size of the cell spreading area (day 1), and for evaluating cell shape and cell viability (days 1, 4 and 7 after seeding). The size of the cell spreading area was measured using Atlas Software (Tescan Ltd., Brno, Czech Republic). The viability of the cells was determined by the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (Invitrogen, Molecular Probes, USA).

The larger samples (30x30 mm) were inserted into GAMA polystyrene dishes (diameter 5 cm; GAMA Group Joint-Stock Company, Ceske Budejovice, Czech Republic) and seeded with 300 000 cells/dish (approx. 15 300 cells/cm<sup>2</sup>) suspended in 9 ml of the above mentioned culture medium. These samples were used for evaluating the cell number on days 1, 4 and 7 after seeding, using a Beckman Vi-CELL XR Cell Analyser automatic cell counter.

For the *in vitro* analysis of markers of osteogenic differentiation and cell immune activation, human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were used. The samples (9x9 mm) were inserted into polystyrene 24-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland; well diameter 1.5 cm). Each well contained 25 000 cells (approx. 14 150 cells/cm<sup>2</sup>) and 1.5 ml of Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, USA, Cat. No. 10270-106) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco, Cat. No. 10270-106) and gentamicin (40 µg/ml, LEK, Slovenia). The cells were cultured for 1, 4, or 7 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub> in the air. On day 4 after seeding, the medium was changed; one half of the samples contained standard medium DMEM with 10% foetal bovine serum and gentamicin (40 µg/ml) mentioned above, and the second half contained osteogenic medium, i.e. the standard medium further supplemented with β-glycerophosphate, L-glutamin, ascorbic acid, dihydroxyvitamin D3, dexamethason, 10% foetal bovine serum and gentamicin (40 µg/ml).

Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), we measured the concentration of the Inter-cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1, a marker of cell immune activation) and osteocalcin (a marker of osteogenic cell differentiation). These measurements were performed in homogenates of cells on days 4 and 7 after seeding, and the concentration of both



markers was measured per cell or per mg of protein. On day 7, the amount of osteocalcin was measured and compared in cells cultured in the standard and osteogenic media.

We also measured TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , i.e. other markers of cell immune activation. These cytokines are important mediators of the inflammatory response, and they are involved in a variety of cellular activities, including cell proliferation and differentiation. We measured the secretion of these markers into the cell culture medium in murine macrophage-like RAW 264.7 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA). The samples (9x9 mm) were inserted into polystyrene 24-well cell culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland; well diameter 1.5 cm). Each well contained 30,000 (approx. 16 980 cells/cm<sup>2</sup>) cells and 1.5 ml of the culture medium. RAW 264.7 cells were cultured in the RPMI-1640 medium (Sigma; 10% fetal bovine serum, 40  $\mu$ g/mL gentamicin).

After 7 days of cultivation, the cell culture medium was collected and used for measuring the concentration of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by a sandwich ELISA using commercially available kits. A mouse TNF- $\alpha$  kit and an IL-1 $\beta$  Quantikine ELISA kit were used for the RAW 264.7 cells. Both kits were purchased from R and D Systems (Minneapolis, MN) and used according to the manufacturer's protocol.

The results indicated that the number of initially adhering MG 63 cells on day 1 after seeding was significantly lower on the titanium (5320 $\pm$ 390 cells/cm<sup>2</sup>) and on the stainless steel (4110 $\pm$ 370 cells/cm<sup>2</sup>) than on the control polystyrene culture dishes (7740 $\pm$ 350 cells/cm<sup>2</sup>). However, on day 4 after seeding, the cell population density on both metallic materials became significantly higher than on the control polystyrene dishes (75200 $\pm$ 2890 cells/cm<sup>2</sup> on Ti and 90 870 $\pm$ 2350 cells/cm<sup>2</sup> on steel vs. 56440 $\pm$ 1180 cells/cm<sup>2</sup> on polystyrene). This suggests faster cell proliferation on both metallic materials than on polystyrene. At the same time, the cell number on the stainless steel samples was significantly higher than on the Ti samples. On day 7, the differences in the number of adhered cells on the two metals and on the control polystyrene substrate was on an average similar (from 328780 $\pm$ 680 cells/cm<sup>2</sup> to 362200 $\pm$ 760 cells/cm<sup>2</sup>). The cell viability on all tested materials was almost 100% in all culture intervals. The morphology of the cells adhered on the studied materials was similar to the morphology of the cells on the control polystyrene dishes, i.e. the cells were mostly flat and polygonal, and the size of their cell spreading areas was similar on all tested materials. The cells were distributed homogeneously on the entire material surface, and on day 4 they started to form confluent cell layers.

On day 4, we measured the amount of ICAM-1 by the ELISA test. This immunoglobulin molecule is typically expressed on cells of the immune system, but it is also expressed on other cell types, including MG 63, during their immune activation, e.g. by an artificial growth support. In this case, ICAM-1 molecules on cells are bound by  $\beta$ 2-integrin receptors on inflammatory cells (for a review, see [4]). Surprisingly, titanium seemed to be more immunogenic than stainless steel, which was indicated by a higher concentration of ICAM-1 per cell and mg of protein in cells on day 4 after seeding. However, on day 7, there was no difference between the concentrations of ICAM-1 per cell and mg of protein in cells on titanium and on stainless steel.

The second molecule that we measured was osteocalcin, a calcium-binding extracellular matrix glycoprotein, an important marker of the bone formation process. The concentration of osteocalcin on day 4 in the standard culture medium was higher in MG 63 cells on the titanium and stainless steel than on the control polystyrene samples. This could be explained by the fact that the metals are harder than polystyrene. It is known that harder substrates promote osteogenic cell differentiation, while softer substrates direct the cell differentiation towards neural or muscle phenotype [5]. In addition, the osteogenic differentiation was further supported by the osteogenic medium, as indicated by a higher concentration of osteocalcin in cells grown in this medium compared to cells in the standard medium on day 7 after seeding.

On day 7 after seeding murine macrophage-like RAW 264.7 cells on the tested materials, the concentration of TNF- $\alpha$  in the culture medium ranged on an average from 57.10 to 79.39 pg per 2000000 cells. The concentration of TNF- $\alpha$  in the medium from Ti and Fe was significantly higher than in the medium from the control polystyrene dishes. The highest value (79.39 pg/2000000 cells) was found in the medium taken from RAW 264.7 cells on Ti.

The second molecule that we tested was IL-1 $\beta$ . No significant differences in the concentration of IL-1 $\beta$  were detected in the culture medium obtained from RAW 264.7 cells on all tested materials. In other words, neither type of metallic material, i.e. Ti and Fe, evoked significantly higher production of IL-1 $\beta$  by RAW 264.7 cells than standard polystyrene cell culture dishes.

It can be concluded that the tests of biocompatibility and immune activation confirmed that titanium and stainless are promising for construction of bone implants and for good integration with the surrounding bone tissue.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 130-131]

## Acknowledgements

Supported by the Technological Agency of the Czech Republic (grant No. TA01011141) and by the Grant Agency of the Czech Republic (grants No. P108/10/1858 and P107/12/1025). We also thank Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) for his language revision of the text.

## References

- [1] Geetha M, Singh AK, Asokamani R, Gogia AK: Progress in Materials Science 54: 397-425, 2009.
- [2] Revell, PA, Lator, PA.: Acta Orthop Scand. 66: 484, 1995.
- [3] Haug RH: J Oral Maxillofac Surg 54: 611-617, 1996.
- [4] Bačáková L, Mareš V, Lisá V, Švorčík V: Biomaterials 21: 1173-1179, 2000.
- [5] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: Cell 126: 677-689, 2006.



# ARTIFICIAL EXTRACELLULAR MATRICES OF COLLAGEN FIBRILS AND LACTOFERRIN AS COATINGS TO ENHANCE OSTEOBLAST BEHAVIOR

MARTA VANDROVCOVA<sup>1</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>, PETER DUBRUEL<sup>2</sup>,  
TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, DEPT. OF BIOMATERIALS AND TISSUE ENGINEERING, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP, GHENT UNIVERSITY, BELGIUM

\*MAILTO: TIMOTHY.DOUGLAS@UGENT.BE

## Abstract

*Lactoferrin, a glycoprotein found in milk, has stimulated osteoblast proliferation and differentiation, but has remained relatively unexplored as a biomaterial component. In this study, artificial extracellular matrices consisting of fibrils of collagen type I containing lactoferrin were used as coatings for the biocompatible polymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA).*

*The numbers of cells, their viability and proliferation rate were evaluated in various time intervals. Additionally, cell initial spreading area on day 1 was measured.*

*The results show that lactoferrin accelerates fibrillogenesis, leads to increased osteoblast cell numbers 1 and 3 days post-seeding, and encourages their proliferation in each of the tested time intervals.*

**Keywords:** coating, collagen, osteoblast, proliferation, extracellular matrix, lactoferrin

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 132-134]

## Introduction

Lactoferrin is an 80 kD glycoprotein found in milk, which has stimulated osteoblast proliferation and differentiation as a component of a cell culture medium [1,2]. As a component of collagen membranes, lactoferrin has also promoted osteoblast differentiation [3]. However, collagen-lactoferrin interactions remain relatively unelucidated in the literature. In addition, the effect of lactoferrin as a biomaterial coating is relatively unexplored. In this study, artificial extracellular matrices consisting of collagen type I fibrils were used to coat sheets of the widely-used biocompatible polymer material poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), as in our previous work [4]. Lactoferrin was incorporated into fibrils during fibrillogenesis, or during fibril formation. PLGA was coated by allowing these fibrils to adsorb onto the PLGA surface. Collagen gels formed as a result of fibrillogenesis. The effect of lactoferrin on the kinetics of fibrillogenesis was also investigated.

## Materials and methods

Collagen fibril gels 0.5 mL in volume were formed according to the Karamichos method [5]. Briefly, 0.4 mL of type I rat tail collagen (BD Biosciences, 354231) at a concentration of 1 mg/mL in 0.1 M HCl was added to 0.05 mL of 10 x Eagle's Minimum Essential Medium (MEM; Sigma-Aldrich, M0275) and either 0.05 mL 10 mg/ml lactoferrin (from bovine milk;

Sigma-Aldrich, L9507) in Milli-Q water or 0.05 mL Milli-Q. This yielded a final collagen concentration of 0.8 mg/mL. The lactoferrin concentrations were 1 mg/mL or 0 mg/mL for the lactoferrin-free controls. After dropwise neutralization with 1 M sodium hydroxide, gel formation took place at 37°C in a water bath.

The gelation kinetics at 37°C was investigated by performing rheometry using a flat plate-shaped rotating head of diameter 25 mm and measuring storage modulus at a strain of 0.1% and angular frequency of 10 rad/s over a period of 1000 s.

Circular PLGA (85:15, PURAC, Netherlands) films 0.5 mm in thickness and 12 mm in diameter were coated with fibrils by suspending the film overnight in the neutralized collagen solution during fibrillogenesis. The coated films were rinsed three times in Milli-Q and were subsequently air-dried in a fume hood for 1 hour.

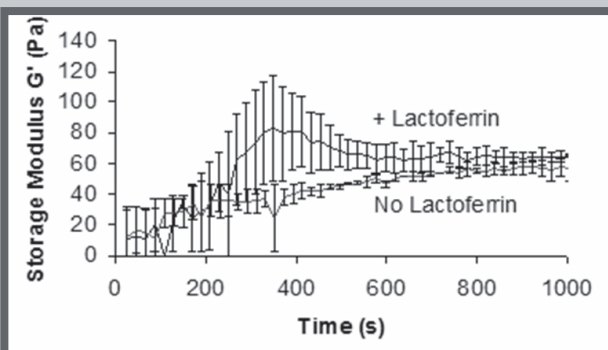
The samples were sterilized using ethylene oxide, inserted into 24-well cell culture polystyrene plates (TPP, Switzerland; well diameter 1.5 cm) and filled with 2 mL of McCoy medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and gentamicin, with a suspension of human osteoblast cell line SaOs-2. Each well contained 30000 cells (i.e., approximately 17000 cells/cm<sup>2</sup>). The cells were cultured for 1, 3, and 7 days at 37°C in a humidified air atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The cell population densities on days 1 and 3, cell spreading area on day 1, BrdU incorporation on days 1, 3 and 7, and viability on day 1 and 7 were evaluated, and were compared with the values of cells on the control microscopic glass coverslips.

On day 1 after seeding, cells were fixed with 70% frozen methanol and stained with a combination of two fluorescence dyes, i.e. Hoechst #33258 (Sigma-Aldrich, Cat. No. B1155; 5 µg/mL), which stains the cell nuclei, and Texas Red C2-maleimide (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. No. T6008; 20 ng/mL), which stains the cell membrane and cytoplasm. The number of cells and their shape on the material surface were evaluated on microphotographs taken under an IX-51 microscope, equipped with a DP 70 digital camera. In addition, the viability was determined by the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (Invitrogen, Molecular Probes, Cat. No. MP03224) according to the manufacturer's protocol. Live and dead cells were then counted on microphotographs taken under the same microscope.

On day 3 after seeding, the presence of  $\beta$ 1 integrins (i.e., an important group of cell-matrix adhesion receptors on osteoblasts, supporting their differentiation and their sensitivity to surface properties of the material) and vinculin (protein of focal adhesion plaques, participating in cell-substrate adhesion and stabilizing the focal adhesions) in SaOs-2 cells was evaluated by immunofluorescence staining. The cell were fixed with 70% frozen methanol and were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-human integrin  $\beta$ 1, and mouse monoclonal anti-human vinculin (Chemicon International, Cat. No. MAB1981 and Sigma, Cat. No. V9131, respectively). The secondary antibody was goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> fragment of IgG, conjugated with Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Molecular Probes, Cat. No. A11017). Additionally, the nuclei were stained with Hoechst #33258. After incubation with the secondary antibody and Hoechst, the cells were evaluated under a confocal microscope (Leica SPE, Germany).

On day 7 after seeding, cells were detached using a trypsin-EDTA solution in PBS, and their viability was evaluated using a Vi-CELL XR analyzer (Beckman Coulter, USA).

At each time interval (day 1, 3 and 7 after seeding), the cell proliferation activity was evaluated by incorporating BrdU into the dividing cells (in S-phase) by a Cell Prolifera-



**FIG. 1.** Kinetics of collagen gel formation in the presence and absence of lactoferrin. Data presented as mean  $\pm$  S.D. from 3 measurements.

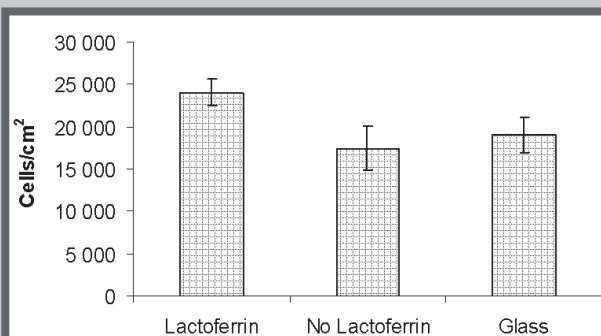
tion ELISA kit, BrdU (colorimetric) (Roche, Cat. No. 11 647 229 001). At each time interval, BrdU was added to the culture medium for the last 3 hours of cell cultivation.

The quantitative results were presented as mean  $\pm$  S.D. (Standard Deviation) or mean  $\pm$  S.E.M. (Standard Error of Mean). Statistical analyses were performed using SigmaStat (Jandel Corp., U.S.A.). Multiple comparison procedures were made by the One Way Analysis of Variance (ANOVA), Student-Newman-Keuls method. P values equal to or less than 0.05 were considered significant.

## Results and discussions

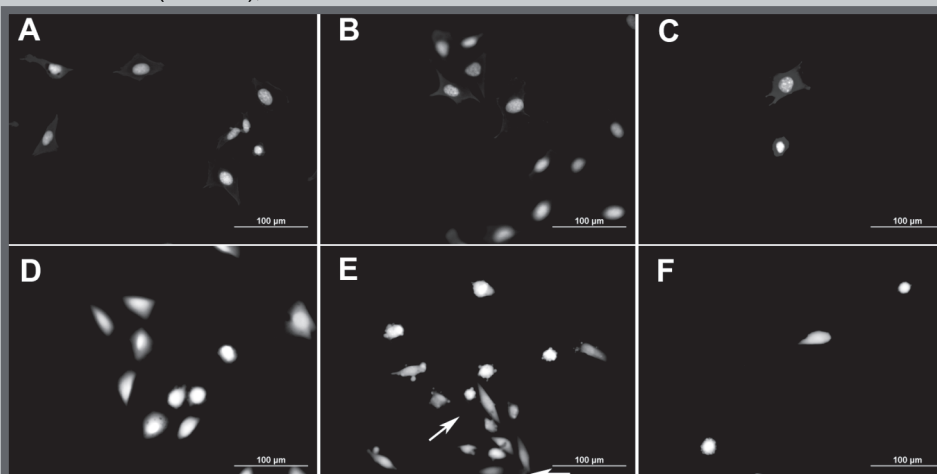
Rheometric time sweeps (FIG. 1) showed that the presence of lactoferrin accelerated collagen gel formation, suggesting an interaction between collagen and lactoferrin. Gels formed in the presence of lactoferrin were not weaker after 1000 s.

On day 1 after seeding, the highest number of cells was found on samples with lactoferrin in comparison with the control microscopic glass coverslips ( $8380 \pm 510$  and  $5190 \pm 610$ , respectively;  $P \leq 0.05$ ; FIG. 2). A very similar picture of cell numbers was reached on day 3 after seeding

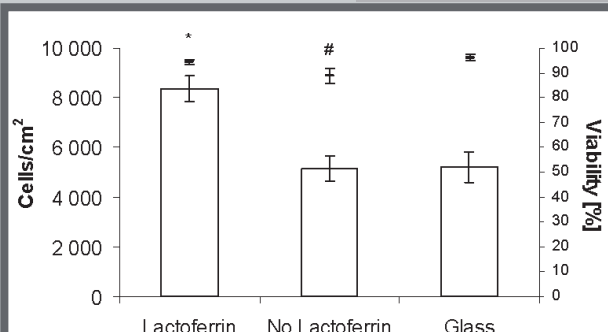


**FIG. 3.** Number of SaOs-2 cells on day 3 after seeding. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. from 36 measurements. There was no significant difference compared to the control microscopic glass coverslips ( $P \leq 0.05$ )

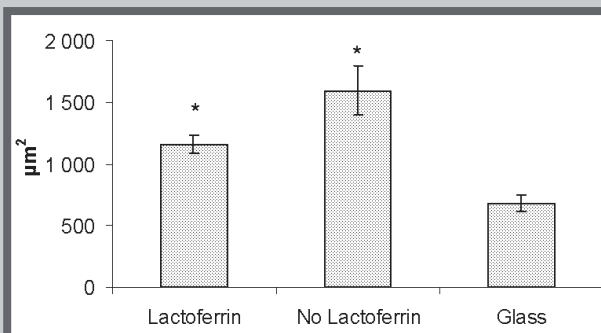
( $24070 \pm 1610$  and  $19030 \pm 2060$  on samples with lactoferrin and glass, respectively), though this difference was not significant (FIG. 3). The cells on the tested samples, particularly PLGA with collagen I or with collagen I and lactoferrin, were mostly polygonal and well spread (FIG. 4 A-C). The largest cell spreading areas were developed on the samples without



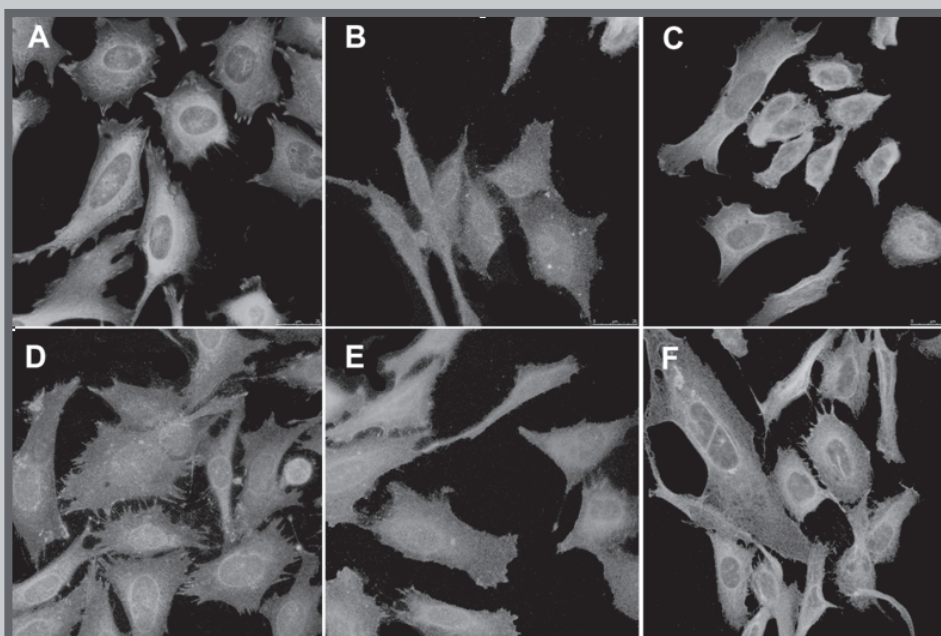
**FIG. 4.** Human osteoblast SaOs-2 cells in 1-day-old cultures on samples with lactoferrin (A,D), without lactoferrin (B,E), and on the control microscopic glass coverslips (C,F). The cell nuclei were stained with Hoechst #33258, and the cell membrane and cytoplasm were stained with Texas Red C2-maleimide. The LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit was used (D,E,F) to determine live and dead cells. Arrows depict dead cells. Olympus IX 51 microscope, objective 20x, DP 70 digital camera, bar = 100  $\mu$ m.



**FIG. 2.** Number of SaOs-2 cells and their viability on day 1 after seeding. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. from 16 measurements. The cell number (\*) and viability (#) different significantly from the values on the control microscopic glass coverslips ( $P \leq 0.05$ ).



**FIG. 5.** Cell spreading area ( $\mu\text{m}^2$ ) on day 1 after seeding. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 37 to 55 cells. Statistical significance: \* $P \leq 0.05$  compared to the control microscopic glass coverslips.



**FIG. 6.** Immunofluorescence staining of vinculin (A,B,C) and  $\beta 1$  integrin (D,E,F) in human osteoblast SaOs-2 cells in 3-day-old cultures on samples with lactoferrin (A,D), without lactoferrin (B,E), and on the control microscopic glass coverslips (C,F). The cell nuclei were counterstained with Hoechst #33258. A well-spread cell morphology and a higher number and greater size of focal adhesion complexes on the cell edges were observed on samples with lactoferrin. Confocal laser scanning microscope (Leica SPE, Germany); bar = 25  $\mu\text{m}$ .

lactoferrin (i.e., PLGA coated with collagen I only) on day 1 after seeding ( $1590 \pm 200 \mu\text{m}^2$ ). However, cells on samples with lactoferrin have bigger spreading areas than the cells on the control microscopic glass coverslips ( $1160 \pm 70$  and  $680 \pm 70 \mu\text{m}^2$ , respectively; FIG.5). In addition, the cells on the lactoferrin-containing samples had more numerous and better developed focal adhesion plaques, as revealed by immunofluorescence staining of vinculin and  $\beta 1$ -integrins (FIG.6).

On days 1, 3 and 7, BrdU incorporation into the proliferating cells was assessed (BrdU incorporation into the newly synthesized DNA was measured during the last 3 h of cell cultivation). In each time interval, the cells on the lactoferrin samples showed better proliferation than the cells the control microscopic glass coverslips (FIG.7). The cell viability was high, ranging between 89 and 97% on day 1 (FIG.2, 4 D-F), and between 93 and 96% on day 7 after seeding. All these findings are in good correlation with the results in the literature, where lactoferrin has been found to

promote various cell activities [6, 7], including mitotic activity [8,9], and to support cell survival [10].

## Conclusion

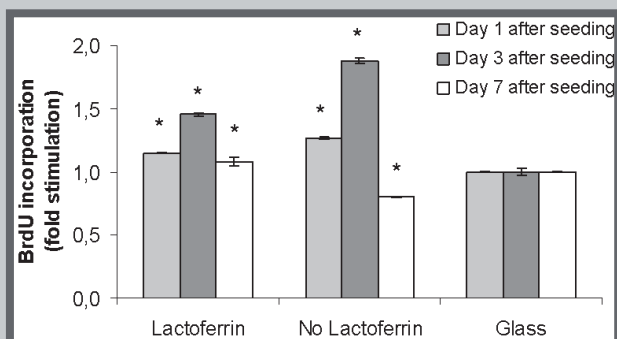
Lactoferrin accelerated collagen gel formation, increased the cell number on days 1 and 3 post-seeding, maintained the viability of cells, and supported their proliferation.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Research Foundation Flanders (FWO) for its support. Further support was provided by the by the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (Project No. NT 13297). We also thank Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) for his language revision of the text.

## References

- [1] NOAT, D., et al. (2005) Clinical Medicine & Research 3, 93-101.
- [2] TAKAYAMA, Y., et al. (2008) Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 72, 226-230.
- [3] TAKAYAMA, Y., et al. (2009) Journal of Bioscience and Bioengineering 107, 191-195.
- [4] VANDROVCOVA, M., et al. (2011) Physiological Research 60, 797-813.
- [5] KARAMICHOS, D., et al. (2006) Journal of Biomedical Materials Research Part A 78, 407-415.
- [6] CORNISH, J., et al. (2004) Endocrinology 149: 4366-4374.
- [7] CORNISH, J. NAOT, D. (2010) Biometals 23: 425-430.
- [8] GREY, A., et al. (2004) Molecular Endocrinology 18: 2268-2278.
- [9] NAOT, D., et al. (2011) Bone 49: 217-224.
- [10] GREY, A., et al. (2006) Molecular and Cellular Endocrinology 251: 96-102.



**FIG. 7.** Effects of lactoferrin on BrdU incorporation into proliferating cells. Data presented as mean  $\pm$  S.E.M. from 4 measurements. Statistical significance: \* $P \leq 0.05$  compared to the values on the control microscopic glass coverslips.



# ACCELERATION OF GELATION AND PROMOTION OF MINERALIZATION OF CHITOSAN HYDROGELS BY ALKALINE PHOSPHATASE

TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>1,2\*</sup>, AGATA SKWARCZYNSKA<sup>3</sup>, ZOFIA MODRZEJEWSKA<sup>3</sup>, LIEVE BALCAEN<sup>4</sup>, DAVID SCHAUBROECK<sup>5</sup>, SYLVIA LYCKE<sup>6</sup>, FRANK VANHAECKE<sup>4</sup>, PETER VANDENABEELE<sup>7</sup>, PETER DUBRUEL<sup>2</sup>, JOHN A. JANSEN<sup>1</sup>, SANDER C.G. LEEUWENBURGH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, RADBOUD UNIVERSITY MEDICAL CENTER NIJMEGEN, THE NETHERLANDS

<sup>2</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S4, 9000 GENT, BELGIUM

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SYSTEMS ENGINEERING, FACULTY OF PROCESS AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,

213 WOLCZANSKA STR., 90-924, ŁÓDŹ, POLAND

<sup>4</sup>DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S12, 9000 GENT, BELGIUM

<sup>5</sup>CENTER FOR MICROSYSTEMS TECHNOLOGY (CMST), ELIS, IMEC, TECHNOLOGIEPARK 914A, 9052 GENT, BELGIUM

<sup>6</sup>RAMAN SPECTROSCOPY RESEARCH GROUP, GHENT UNIVERSITY, KRIJGSLAAN 281 S12, 9000 GENT, BELGIUM

<sup>7</sup>DEPARTMENT OF ARCHAEOLOGY, GHENT UNIVERSITY, SINT-PIETERSNIEUWSTRAAT 35, 9000 GENT, BELGIUM

\*MAILTO: TIMOTHY.DOUGLAS@UGENT.BE

## Abstract

*Thermosensitive chitosan hydrogels containing sodium beta-glycerophosphate ( $\beta$ -GP), whose gelation is induced by increasing temperature to body temperature, were functionalized by incorporation of Alkaline Phosphatase (ALP), an enzyme involved in mineralization of bone. ALP incorporation led to acceleration of gelation upon increase of temperature for four different chitosan preparations of differing molecular weight, as demonstrated by rheometric time sweeps at 37°C. Hydrogels containing ALP were subsequently incubated in calcium glycerophosphate (Ca-GP) solution to induce their mineralization with calcium phosphate (CaP) in order to improve their suitability as materials for bone replacement. Incorporated ALP retained its bioactivity and induced formation of CaP mineral, as confirmed by SEM, FTIR, Raman spectroscopy, XRD, ICP-OES, and increases in dry mass percentage, which rose with increasing ALP concentration and incubation time in Ca-GP solution. The results demonstrate that ALP accelerates formation of thermosensitive chitosan/ $\beta$ -GP hydrogels and induces their mineralization with CaP, which paves the way for applications as injectable bone replacement materials.*

**Keywords:** chitosan, thermosensitivity, mineralization, composite

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 135-136]

## Introduction

Chitosan, a polysaccharide derived by deacetylation of chitin, is biocompatible, biodegradable, non-toxic, non-immunogenic, and possesses antibacterial properties.

Chitosan hydrogels can be formed by neutralization of an acidic chitosan solution by addition of sodium beta-glycerophosphate ( $\beta$ -GP) [1]. These hydrogels have the added advantage of thermosensitivity, i.e. gelation can be induced by increasing temperature to the range 30-60 °C, and allow incorporation of bioactive substances such as enzymes, including alkaline phosphatase (ALP), the enzyme responsible for mineralization of bone. With respect to bone substitution, the presence of a ceramic phase based on calcium phosphate (CaP) leads to a number of advantages, including increased bioactivity (formation of chemical bonds with surrounding bone after implantation) and affinity for biologically active proteins such as growth factors [2]. The strategy of ALP incorporation followed by incubation in a solution containing calcium ions and glycerophosphate (GP) appears to be applicable to a wide range of hydrogels [3]. Both calcium ions and glycerophosphate diffuse into the gels containing ALP. ALP cleaves phosphate ions from glycerophosphate, which are then free to react with calcium ions to form insoluble CaP which precipitates and remains trapped within the gel. The current study aimed to investigate the effect of ALP incorporation on gelation speed. The amount and nature of mineral formed was also investigated.

## Materials and methods

Chitosan hydrogels were produced according to a protocol based on that of Chenite et al. [2] Briefly, 0.4 g chitosan was dissolved in 16ml 0.1M HCl. 10 g sodium glycerophosphate were dissolved in 10ml water. ALP was dissolved in water at concentrations of 0 and 2.5mg/ml. 3.6 ml chitosan solution was mixed with 0.4 ml Na-GP solution and 0.4 ml ALP solution, to yield a chitosan concentration of 20.5 mg/ml, a Na- $\beta$ -GP concentration of 90.9 mg/ml and ALP concentrations of 0 and 0.23 mg/ml. Gelation took place at 37°C overnight. Mineralization was induced by incubation in 0.1M calcium glycerophosphate (Ca-GP). Prior to analysis, hydrogels were rinsed three times with Milli-Q water, then incubated in MilliQ water for 24h with the aim of removing residual Ca-GP. For rheological studies, gel components were mixed in the same proportions, but with a total volume of 0.5 ml. Rheological measurements were carried out on an AR2000 rheometer, TA instruments, using a 20 mm flat plate geometry and a gap of 0.7mm. Time sweeps were performed at 37°C at an oscillatory stress of 5 Pa and frequency of 1Hz. The gelation point was defined as the point where the storage modulus ( $G'$ ) exceeded the value of the loss modulus ( $G''$ ) (Figure a,b). For each chitosan preparation and ALP concentration, measurements were performed at least 3 times. The dry mass percentage, i.e. the gel weight percentage not consisting of water, was calculated as: (weight after incubation and subsequent freeze-drying/weight after incubation but before freeze-drying)\*100. This served as a measure of the extent of mineral formation. Formation of CaP was demonstrated by FTIR, Raman, XRD, SEM and ICP-OES.

## Results and discussions

Addition of ALP accelerated gelation of all four chitosan preparations in this study (FIGURE a,b,c). Gelation times of all four chitosan preparations tested were similar in the absence of ALP and shortened by ALP addition (FIGURE c), which demonstrates the feasibility of ALP-accelerated gelation for different preparations. Mineralization of chitosan hydrogels by ALP was demonstrated by an increase in dry mass percentage with increasing ALP concentration, changes in morphology of chitosan and appearance of mineral-

ized deposits by SEM (Figure d,e). Further evidence was provided by the presence of XRD peaks characteristic for apatite (FIGURE f) and bands typical for CaP in FTIR and Raman spectra (FIGURE g,h), and ICP-OES detection of increases in mass percentage attributable to Ca and P as well as Ca/P molar ratio in hydrogels containing ALP.

## Conclusions

Addition of ALP to chitosan/ $\beta$ -GP solutions not only induces hydrogel mineralization, but also accelerates gelation upon heating to body temperature. Extent of acceleration is dependent on the chitosan preparation used.

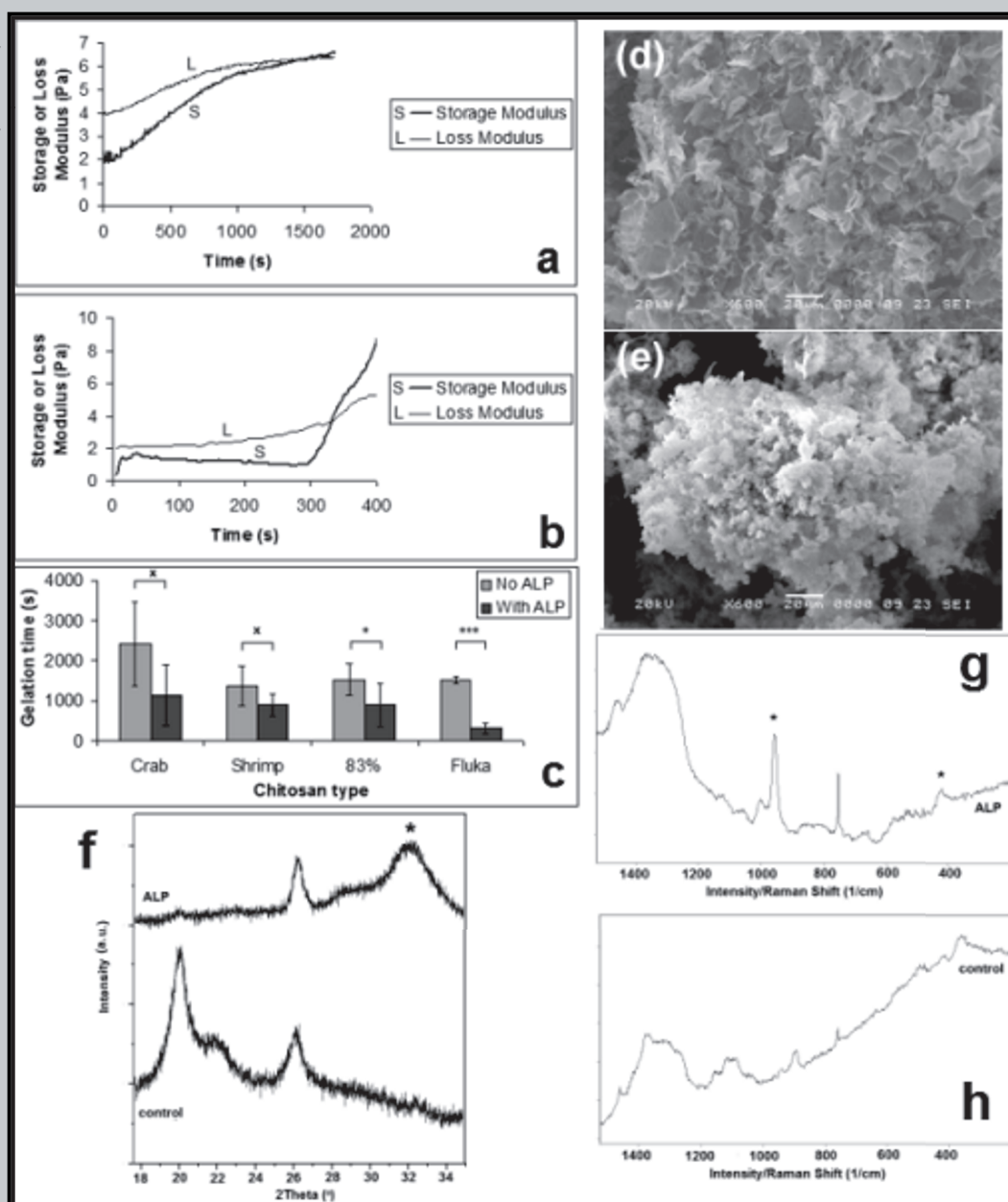


FIGURE (a,b,c) Gel transition point (crossover of  $G'$  (storage modulus) and  $G''$  (loss modulus)) was reached more quickly after addition of ALP. SEM revealed mineral deposits on gels containing ALP (e) which were absent in gels without ALP (d). XRD (f) and Raman (g,h) revealed peaks characteristic for apatite (\*) in gels containing ALP which were absent in gels without ALP.

## Acknowledgments

The authors thank Agentschap NL, project no. SHM08717: Research Foundation Flanders (FWO) and Marcin Sobol and Artur Bartkowiak, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, Poland.

## Piśmiennictwo

- [1] Chenite, A., et al. (2000). Biomaterials, 21(21), 2155-2161.
- [2] Ruhe, P. Q., et al. (2005). J Control Release, 106(1-2), 162-171.

## References

- [3] Douglas, T. E. L., et al. (2012). Macromol Biosci, Epub ahead of print.

# COMPOSITES OF POLYVINYL ALCOHOL (PVA) HYDROGEL AND CALCIUM AND MAGNESIUM PHOSPHATE FORMED BY ENZYMATIC FUNCTIONALIZATION

TIMOTHY E.L. DOUGLAS<sup>1\*</sup>, AGNIESZKA PIEGAT<sup>2</sup>,  
DAVID SCHAUBROECK<sup>3</sup>, MIROSLAWA EL FRAY<sup>2</sup>, PETER DUBRUEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP, GHENT UNIVERSITY, BELGIUM

<sup>2</sup>DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, SZCZECIN, POLAND

<sup>3</sup>CENTER FOR MICROSYSTEMS TECHNOLOGY (CMST), ELIS, IMEC, GHENT, BELGIUM

\*MAILTO: TIMOTHY.DOUGLAS@UGENT.BE

## Abstract

*In this study, polyvinyl alcohol (PVA) hydrogels designed for osteochondral regeneration were mineralized with calcium phosphate (CaP) and magnesium phosphate (MgP) by incorporation of the enzyme alkaline phosphatase (ALP) and incubation in solutions of 0.1 M calcium or magnesium glycerophosphate (CaGP, MgGP). Hydrogels incubated in water served as controls. Dry mass percentage, i.e. the percentage consisting of polymer and mineral and not water, was markedly higher for samples incubated in CaGP and MgGP and decreased in the order: CaGP>MgGP>water. CaP and MgP formation was confirmed by FTIR. SEM revealed spherical deposits characteristic for apatite in samples incubated in CaGP and plate-like crystals of the magnesium phosphate bobierite in samples incubated in MgGP, while samples incubated in water were devoid of deposits. Rheometric testing showed that storage modulus of hydrogels incubated in CaGP and MgGP was markedly higher and decreased in the order: CaGP>MgGP>water. The results prove the principle of enzymatic mineralization of PVA with CaP and MgP to improve their suitability for bone regeneration applications.*

**Keywords:** hydrogel, composite, mineralization, enzyme

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 137-138]

## Introduction

Mineralization of hydrogels with calcium phosphate (CaP) for bone regeneration applications can be realized by addition of the enzyme alkaline phosphatase (ALP) and incubation in a calcium glycerophosphate (CaGP) solution [1]. Mineralization with magnesium phosphate (MgP) is also promising, as MgP has comparable cytocompatibility to CaP and supports osteoblast adhesion and differentiation [2]. In this study, PVA hydrogels designed for osteochondral tissue regeneration [3] were mineralized enzymatically with CaP and MgP by incubation in CaGP and MgGP solutions.

## Materials and methods

Cylindrical PVA hydrogels (10% w/v) of height 5 mm and diameter 8 mm containing ALP at a concentration of

2.5 mg/ml were prepared as described previously [3]. Gel mineralization was induced by incubation in mineralization medium for 14 d in 0.1 M CaGP or MgGP. Samples incubated in Milli-Q water served as a control. Mineralization medium was changed every day. After conclusion of mineralization, gels were rinsed three times in Milli-Q water and subsequently incubated in Milli-Q for 1 d with the aim of removing residual CaGP and MgGP. The dry mass percentage, i.e. the gel weight percentage not consisting of water, was calculated as: (weight after mineralization and subsequent freeze-drying/weight after mineralization but before freeze-drying)\*100. This served as a measure of the extent of mineral formation. Mineral formed was characterized by FTIR and SEM. Mechanical properties were investigated by performing rheometry and measuring storage modulus at a strain of 0.1 % and angular frequency of 10 rad/s.

## Results and discussions

Dry mass percentages increased as a result of incubation in CaGP and MgGP (FIG.1). The values for samples incubated in water, CaGP and MgGP were 12.3±0.6, 28.8±0.6 and 23.0±1.2, respectively. The higher amount of mineral formed in the CaGP group may be due to the lower solubility of CaP relative to MgP.

The formation of CaP and MgP in hydrogels was demonstrated directly by FTIR (FIG.2). Bands typical for PVA became less prominent in samples incubated in CaGP and MgGP. Bands typical for apatite were observed at 1030 and 540 cm<sup>-1</sup> [4] while characteristic bands for bobierite

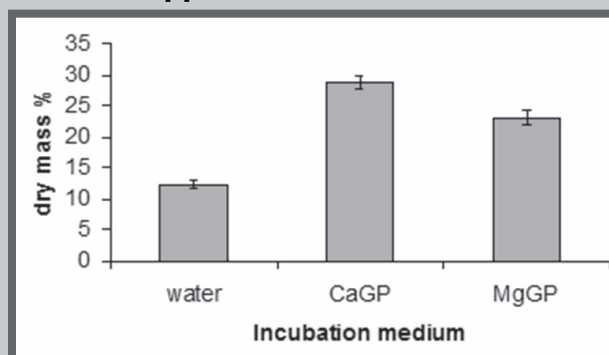


FIG. 1. Dry mass percentage of PVA hydrogels incubated for 14 d in water or 0.1 M CaGP or MgGP (n=3).

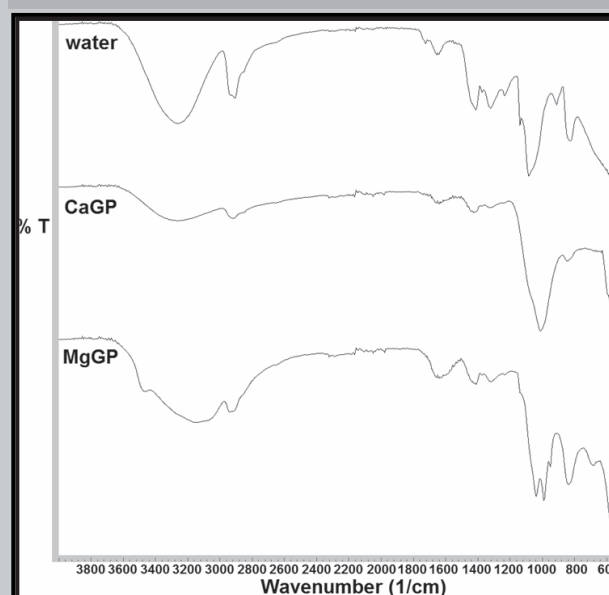


FIG. 2. FTIR spectra of PVA hydrogels incubated for 14 d in water or 0.1 M CaGP or MgGP after lyophilization.



( $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) were seen at 3460, 3150, 1040, 990, 940, 830 and 680, as well as  $540\text{ cm}^{-1}$  [5].

SEM examination (FIG. 3) revealed no mineral deposits on hydrogels incubated in water, however spherical deposits of diameter  $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$  were seen on samples incubated in CaGP, which resemble CaP deposits in enzymatically mineralized hydrogels in previous studies [1]. Plate-like crystals approximately  $5\text{ }\mu\text{m}$  in length and  $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$  in width which resemble bobierrite ( $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) [2] were seen on samples incubated in MgGP.

Rheometric testing (FIG. 4) showed that storage modulus increased by factors of over 100 and 40 as a result of incubation in CaGP and MgGP, respectively. This is consistent with the differences in dry mass percentage (FIG. 1), which serves as a measure of mineral formation.

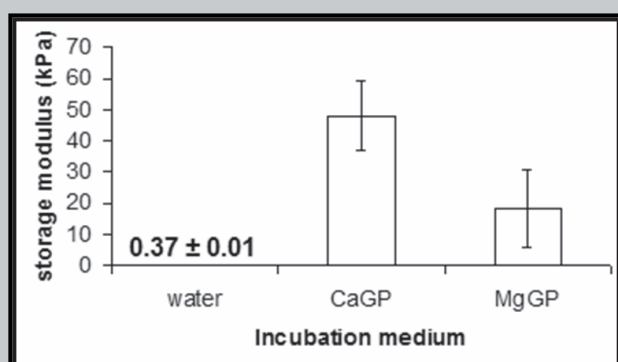


FIG. 4. Storage moduli of PVA hydrogels incubated for 14 d in water or 0.1 M CaGP or MgGP ( $n=3$ ).

## Conclusions

CaP and MgP mineral formation in PVA hydrogels containing ALP was induced by incubation in solutions of CaGP and MgGP. More CaP was formed than MgP. CaP and MgP formed appeared to be predominantly apatite and bobierrite, respectively. Gels containing CaP were stronger than those containing MgP.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the Research Foundation Flanders (FWO) and Ghent University for support.

## Piśmiennictwo

- [1] Douglas T. E. L., et al. (2012) Macromol Biosci.
- [2] Tamimi F., et al. (2012) Acta Biomater, 7, 2678-85.
- [3] El Fray M., et al. (2005) European Polymer Journal, 43, 2035-2040.

## References

- [4] Koutsopoulos S. (2002) J Biomed Mater Res 62:600-612.
- [5] Frost R.L. et al. (2002) Mineralogical Magazine, 66, 1063-1073.

# THERMAL BEHAVIOUR OF FUNCTIONALLY GRADED SODIUM-CONTAINING CALCIUM PHOSPHATES

A.GONCHARENKO, D.ROKHMISTROV, Z.ZYMAN

PHYSICS OF SOLIDS DEPARTMENT, PHYSICS FACULTY,  
V.N. KARAZIN KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY,  
4 SVOBODA SQUARE, 61022 KHARKIV, UKRAINE

## Abstract

Hydroxyapatite (HA),  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and their mixtures have been successfully applied in orthopedic, oral and maxillofacial surgery [1]. Calcium phosphate (CP) bioactive ceramics based on HA is usually fabricated of appropriate powders. Unfortunately, mechanical properties of such material are in general worse than those of human bone. Therefore, there is a necessity for development of new ceramic CP composites with improved characteristics.

An effective biomaterial must simultaneously possess various, often contradictory, properties [2]. A functionally graded material (FGM) with gradients in composition, phase and microstructure from the surface to the interior can better satisfy such combined requirements. Recently, FGM's of sodium-containing calcium phosphates were prepared expecting them to have improved circumstances for bone formation and bonding [3-4].

The aim of this work was to study the thermal behavior of FGM's of sodium – containing calcium phosphates prepared by an original route.

The initial powder was prepared by a simple one-step precipitation using  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  reactants. The synthesis reaction resulted, besides HA, in the by product  $\text{NaNO}_3$ . However, the latter was not washed out of the precipitate but rather used as a source of sodium for ceramics preparation. An original molding step was used resulted in gradient distribution of  $\text{NaNO}_3$  in the compacts. They were sintered under usual conditions.

It has been found that the linear (or volume) shrinkage and the density slightly changed in the fired compacts below  $1100^\circ\text{C}$ . However, the consolidation abruptly increased at  $1100^\circ\text{C}$ . The poor sintering is associated with  $\text{NaNO}_3$  decomposition during heating and firing at temperatures below  $1100^\circ\text{C}$ . At higher temperatures, reactions between HA particles and products of  $\text{NaNO}_3$  decomposition occurred and diffusion processes were intensified. Due to the gradient distribution of  $\text{NaNO}_3$  in the compacts, the indicated thermal processes resulted in formation of functionally graded ceramics (having in particular a phase gradient from the surface to the interior as  $\text{Na}_3\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_5 \rightarrow \beta$ -rhenanite  $\rightarrow \text{Na}^+$  solid solution in HA).

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 139]

## References

- [1] Hench L L, J. Am. Ceram. Soc., 1991, 74, 1487-1510.
- [2] Epple M, Baeuerlein B, Weinheim: Wiley-VCH; 2007.
- [3] Kon M, Ishikawa K, Miyamoto Y and Asaoka K. Biomaterials 1995; 16: 709-714.
- [4] Zyman Z, Goncharenko A, Rokhmistrov D, Epple M. Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2011, 42, 154-157.

# POLYLACTIDE – CARBON NANOTUBES NANOCOMPOSITES AS MEMBRANES FOR GUIDED NERVE REGENERATION (GNR)

E.STODOLAK-ZYCH, A.FRĄCZEK-SZCZYPTA, M.BŁAZEWICZ

AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

## Abstract

New generation of membrane materials can play role in regeneration process in living organism e.g. creation of optimal conditions for regeneration of bone tissue (GBR/GTR technique) or defected peripheral nerve (GNR technique).

However, biodegradable polymeric materials which are now widely used in GNR technique (PLA, PCL, collagen) does not have satisfactory mechanical properties such as strength (RM) or Young's modulus (E) because it is difficult to control their porosity [1,2]. Materials suitable for nerve regeneration should exhibit electrical properties which stimulate the regeneration [3]. The main idea of the guided nerve regeneration is utilisation of a membrane separating two tissues i.e. defected nerve tissue and connective tissue. Inside the defected nerve tissue surrounded by the membrane should be present factors influencing the regeneration process such as: ECM protein, neurotrophic factors. On the other hand, the membrane should act as a barrier for fibroblast cells inflowing into the defected area.

The work presents results of investigations on porous nanocomposite materials basing on biore-sorbable aliphatic polyesters i.e. poly-(L/DL)-lactide and carbon nanotubes (CNT). All materials i.e. nanocomposite foils and porous materials were prepared using synthetic co-polymer of L/DL-lactide with L/DL ratio of 80/20 from Purac®. The polymer had the FDA attestation confirming its biocompatibility. As the nanofillers, two types of CNTs produced by Nanostructured and Amorphous Materials (Inc. Huston, USA) were used: MWCNTs (multi-wall carbon nanotubes; diameter 10-30 nm and length 1-2  $\mu\text{m}$ ) and SWCNTs (single-wall carbon nanotubes; diameter 0.7-2 nm and length 15-30  $\mu\text{m}$ ). Nanocomposite membrane materials (PLDLA/0.5% wt. MWCNTs and PLDLA/0.5% wt. SWCNTs) were prepared using combined methods: phase inversion and freeze-drying. Porous microstructure of the nanocomposites was investigated using SEM/EDS. It was found, that the presence of the CNT influenced shape, size (5-50  $\mu\text{m}$ ) and distribution of pores in the material (total porosity of PLDLA/MWCNTs was about ~65% and PLDLA/SWCNTs was about ~35%). The nanoadditives increased mechanical properties of the membrane materials. For example addition of the SWCNTs increased the membrane strength (RM) from 16 to 24 MPa. Physicochemical properties of the materials surface were investigated by means of wettability and surface energy measurements. It was shown that dispersion part of surface free energy decreased when SWCNTs were used as additives (from 4.5 mm/mJ PLDLA membrane to 0.7 mm/mJ PLDLA/SWCNTs), while in the case of the

MWCNTs addition dispersion part of surface energy increased from 4.5 mm/mJ to 6.9 mm/mJ.

Such PLDLA-based materials modified with CNTs (MWCNTs, SWCNTs) may be an attractive support for adhering cells. SWCNTs were more suitable nanoaditives for PLDLA-matrix membranes than MWCNTs, because such membranes were stronger, hydrophilic and much more bioactive.

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 139-140]

## Acknowledgments

This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, project no N N507 401939

## References

- [1] A. Piattelli, A. Scarano, M. Paolantonio, *Biomaterials* 17 (1996) 1725-1731.
- [2] K. Fuijehara, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Biomaterials* 26 (2005) 4139-4147.
- [3] Aslan M. Simsek G. Dayi E. J. *Contemp Dent Pract* 5 (2004) 1-7.

# BIOLOGICAL PROPERTY POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE) AS POTENTIAL MATERIAL FOR REPRODUCTION DEVICES

JAROSŁAW WIECZOREK<sup>1\*</sup>, EWA STODOLAK-ZYCH<sup>2</sup>,  
YURIY KOSENYUK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF ANIMAL PRODUCTION,  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY OF ANIMAL REPRODUCTION,  
1 KRAKOWSKA, 32-083 BALICE, POLAND

<sup>2</sup>AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND

\*MAILTO: JAROSLAW.WIECZOREK@IZOO.KRAKOW.PL

## Abstract

The main limitation of embryos transfer is the lack of catheters for their obtaining and transferring which would have desirable and confirmed biological properties ensuring high bioconcordance and low toxicity. Catheters used routinely for embryos obtaining and transfer are tools used for insemination, urology and other medical purposes, but their bioconcordance with embryos was never confirmed.

For these reasons in our studies we attempted to develop the modern set of catheters designed for the contact with embryos, based on the biomaterial characterized by good biological and mechanical properties such as with optimal resilience and elastic properties, and capable to be free shaped in the form of a tube of 1–2 mm diameter. The material which hypothetically fulfills biological requirements and at the same time gives possibility of free shaping is resorbable polymer used for the long time in many fields of medicine is poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL). Because of its biological and physical properties it was taken into consideration to use this biomaterial for in vitro embryos culture and for cryoconservation.

The aim of the study was verification of biological properties of poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) as the material dedicated to biotechnology of animal reproduction and gynecology and evaluation of possibility of poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) application as a potential material for production of medical devices, as catheters for obtaining and transporting of embryos as well as dishes for embryos culture in vitro and covers for cryoconservation. The possible application of this biomaterial needs verification of its biological properties on embryos culture. The foil discs made of the polycaprolactone, thickness 0.5 mm, diameter 3.5 mm, were prepared in two forms: the reference one (nPCL) and thermally modified by freezing in liquid nitrogen (mPCL). The verification of PCL bioconcordance was performed by evaluation of 102 pig embryos at the development stage of 2 to 4 blastomers. To evaluate poly- $\epsilon$ -caprolactone bioconcordance 5-day long culture of the embryos was performed on the evaluating material, not frozen (nPCL) and frozen in liquid nitrogen (mPCL) and additionally culture after short contact with poly- $\epsilon$ -caprolactone lasting 15 minutes (nPCL-15). In all evaluated study groups the development of embryos was suppressed shortly after transfer to the culture with PCL. In the control group 74-78% of the embryos reached blastocyst stage. Because of cytotoxic influence of polycaprolactone on embryos it cannot be used as the material for catheter production used in biotechnology of animal reproduction and other materials used for in vitro culture and cryoconservation.

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 140]

## Acknowledgment

This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, project no N N302 632140



# IN VIVO APPLICATION OF FOAM TITANIUM IMPLANTS WITH MAGNESIUM-DOPED OCTACALCIUM PHOSPHATE AND HYDROXYAPATITE THIN FILMS DEPOSITED BY PLD METHOD

W.MRÓZ<sup>1</sup>, B.BUDNER<sup>1</sup>, R.ZAŁĘCZNY<sup>1</sup>, A.PROKOPIUK<sup>1</sup>, K.NIEDZIELSKI<sup>2</sup>, A.SŁÓWICKI<sup>3</sup>, T.E.L.DOUGLAS<sup>4</sup>, D.SCHARZE<sup>5</sup>

<sup>1</sup>MILITARY UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF OPTOELECTRONICS,

2 GEN.S.KALISKIEGO STR., 00-908 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup>MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS,  
POLISH MOTHER MEMORIAL HOSPITAL,  
281/289 RZGOWSKA STR., 93-338 ŁÓDŹ, POLAND

<sup>3</sup>AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKÓW, POLAND

<sup>4</sup>Ghent University,  
POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP,  
CAMPUS STERRE, BUILDING S4,  
KRIJGSLAAN 281, 9000 GENT, BELGIUM

<sup>5</sup>SLM SOLUTIONS GMBH, ROGGENHORSTER STRASSE 9C,  
23556 LÜBECK, GERMANY

## Abstract

Results of investigations into integration of foam titanium implants (FTI), with rabbit bone are presented. Three groups of implants were examined: clean titanium implants produced by selective laser melting, FTI coated with a thin film of octacalcium phosphate (OCP), doped with 0.6 weight percent of Mg, deposited by pulsed laser deposition (PLD), and FTI with hydroxyapatite (HA) doped with 0.6 wt.% of Mg.

Analysis of histopathology of implants' integration with bone were performed by staining using the triple chromatographic method of Masson - Goldner, planimetric analysis using the Kruskal - Wallis test, an ANOVA test and microtomography. The best results were obtained for implants coated with HA, followed by those coated with OCP. Implants from these two groups showed superior integration with bone than uncoated titanium implants.

**Key words:** PLD, foam titanium implants, in vivo, OCP, HA

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 141]

# EVALUATION OF REPAIR OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS IN RABBITS USING NEW COMPOSITE BIOMATERIALS DURING THREE-MONTH OBSERVATION

B.ŻYLIŃSKA<sup>1</sup>, E.STODOLAK-ZYCH<sup>2</sup>, K.NOWICKA<sup>2</sup>, P.SILMANOWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UP – UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IN LUBLIN,  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,  
DEPARTMENT AND CLINIC OF ANIMAL SURGERY,  
30 GŁĘBOKA STR., 20-612 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup>AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKÓW, POLAND

## Abstract

In this work nanocomposite porous pins were implanted into rabbit knees. The pins were made of biodegradable synthetic poly-L/DL-lactide (80:20) which was modified with nanometric hydroxyapatite particles (HAp) and covered with biopolymer layer of sodium alginate (NA). In vivo experiments were conducted on a 4-element group of the New Zealand rabbits. Osteogenesis was observed using scanning electron microscope (SEM/EDS) after 12 weeks of implantation.

**Key words:** osteochondral defects, regenerative medicine, scaffolds, hydroxyapatite, alginate

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117, (2012), 141-143]

## Introduction

Repair of osteochondral defects is the major clinical problem in orthopedics and still an unsolved issue. Articular cartilage is avascular and relatively acellular with low level of mitotic activity. Thus it displays a poor capacity for self-repair. Fibrocartilaginous substitute tissue which spontaneously fills osteochondral defects has completely different molecular composition and biomechanical properties. With time it tends to degenerate and fails to withstand loading during the joint movement. Nowadays, materials for tissue engineering and materials support for regenerative medicine are the most promising and alternative in the treatment of osteochondral defect. The main goal is to develop a new biomaterial that will enhance and encourage repair of such defects so the newly formed tissue would mimic in the largest extent the precise composition of the native one which is vital in regaining and maintaining a fully functional joint. An ideal scaffold should possess suitable stability, biocompatibility, permeability, porosity and three-dimensional structure. It should also have osteoconductive and chondroconductive properties to promote proliferation and migration of cells and to enhance the tissue ingrowth.

In this regard, increasing attention has been given to biodegradable polymers such as PLDLA, PCL, PGLA and biopolymers such as alginates, hyaluronan, chitosan (CS) and its compositions. Biopolymers could improve osteoblasts and chondrocyte attachment to poly(L-lactic acid) (PLLA), and stimulated of increase cell adhesion, proliferation and cells metabolism activity [1-2]. The intra-articular injection

of chitosan has shown an increase of epiphyseal cartilage on tibial and femoral joints with simultaneous activation of chondrocyte proliferation. In order to increase cellular adhesiveness of chitosan Some authors shown that chitosan/alginate-hyaluronan complexes with or without covalent attachment of RGD-containing proteins could stimulated cells grown [3]. Implantation of chondrocyte-seeded scaffolds into the rabbit knee with cartilage defects caused their partial repair. Another authors modified three-dimensional biodegradable PLA-alginate scaffold by TGF- $\beta$ 1 to support the attachment/retention of osteoblasts and for chondrogenic differentiation of MSCs, while conferring mechanical stability to the construct [4]. Marijnissen et al. compared demineralized bone matrix to a PLA-PGA fleece, both used in conjunction with alginate gel, in their capacity to support the chondrocytic phenotype in vivo. Structural homogeneity as well as the number of type II collagen positive cells was found to be higher in the PLA-PGA-alginate constructs, once again confirming the well-suited applicability of such biodegradable polymers to the repair of cartilage and bone defects [5]. The most promising materials for stimulated bone tissue regeneration are polymeric nanocomposites containing such ceramic nanoparticles as; HA, TCP or SiO<sub>2</sub>. A small amount of the nanoparticles improves bioactivity of the material and causes its better osteointegration with the surrounded bone tissue [6]. Nanocomposite materials produced and investigated during this study combined two properties of traditional biomaterials i.e.; bioactivity which supports osteoblast proliferatin and biopolymer structure which is suitable for adhesion and proliferation of chondrocytes.

## Materials and methods

Nanocomposite sponges formed in pin shape were used in our research. These implants were made of poly (L/DL) lactide (PLDLA; 80:20, Purasorb, PURAC) enriched in bioactive nanoparticles of hydrokxyapatite (3-60 nm, HA, Sigma-Aldrich) and sodium alginate (NA). The materials were obtained by a modified solvent casting/salt particulate leaching method using sodium chloride as pore former leading to pores of 100-300  $\mu$ m diameter. Cylindrical pins were obtained with dimensions of 4 $\times$ 6 mm. Finally they were immersed in 1% solution of NA (FGM Biopolimer, Norway) and dried in vacuum (35°C/48h). In vivo experiment was conducted on the four New Zealand rabbits. Under general anaes-

thesia (using xylazine 5 mg/kg and ketamine 25 mg/kg) a lateral approach to the stifle joint under sterile conditions was made. After lateral arthrotomy and medial patellar luxation the femoral trochlea was visualized. Using a drill a cylindrical hole (4 $\times$ 5 mm) was created in trochlear groove imitating osteochondral defect (FIG. 1). Then the defect was filled with the prepared biomaterial using press-fitting method. The joint capsule, fascia and skin were closed in a routine manner. After the operation all rabbits were allowed to move freely in cages without any splints. The animals were sacrificed at 3 months after implantation. The femoral trochleas were harvested, fixed in 4% paraformaldehyde solution and submitted to further analysis. The specimens were adequately cut and underwent dehydration using ethanol in different concentrations (20, 40 i 97%) for 24h. Scanning electron microscope (Nova NanoSEM, FEI) observation of multilevel microstructure was performed.

## Results

Preliminary studies in vitro condition showed that biomaterials were biocompatible [7]. High porosity of these sponges (diameter of pores was 100-300  $\mu$ m) and a system of interconnective pores makes them suitable for cells migration, deposition and blood vessels ingrowth. Three dimensional structure mimics internal arrangement of bone and cartilage extracellular matrix. This is conducive to interactions between cells and matrix components. In the organism's environment the sodium ions from NA are exchanged with the calcium ions. Newly formed calcium-sodium alginate is more solid and enhances faster defect consolidation. SEM microphotographs showed complete integration between

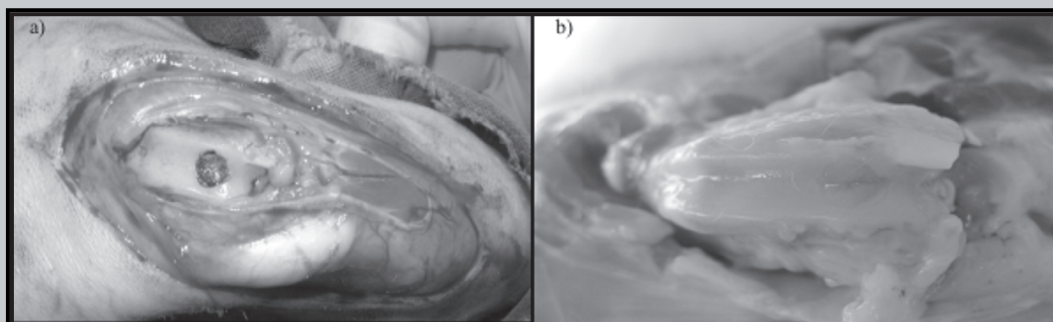


FIG. 1. Macroscopic appearance of tissue defect after 3 months from surgery (a). Intraoperative view of a defect in trochlear groove filled with the implant material (b).

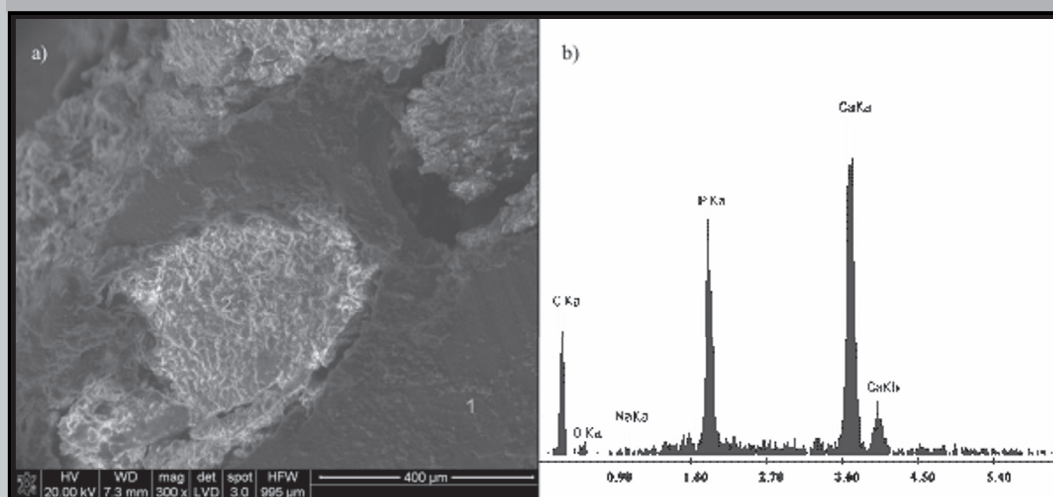
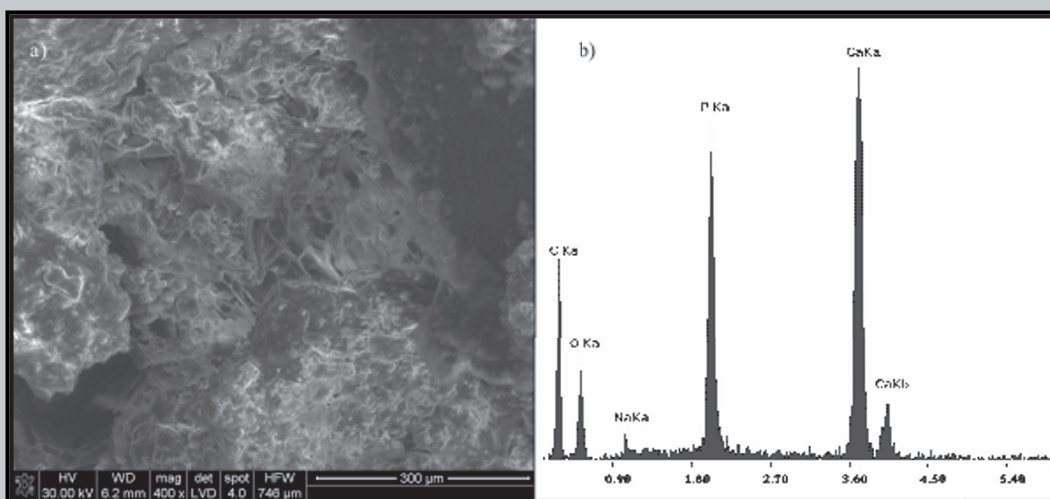


FIG. 2. SEM microphotograph of the implant surrounded by the bone tissue (a), EDS point analysis of newly created tissue (point 1).

implant and bone surfaces (FIG. 2a-3a). By means of EDS analysis (Genesis) the elemental composition of specimen was confirmed. As elements to detect were chose phosphorus, calcium and sodium. Punctual EDS analysis in the region of biomaterial – appears as smooth place on the picture – showed increased concentration of Na, Ca and P. In the region of bone – rough surface on the picture – minimal amount of Na and increased ratio of Ca:P were detected. Increased Ca and P concentration compared to carbon confirms the presence of bone. The linear EDS analysis also detected characteristic distribution of elements depending on particular regions of specimen. In the segment that was relevant to implant sodium concentration was high. On the contrary – in the section of bone sodium concentration was minimal. The average EDS analysis of the whole region of implantation showed on FIG.3b confirmed high concentrations of Ca and P which indicates good integration and colonization of material by new bone tissue. It was proved that the tested composite biomaterials because of its porosity, composition and bioactivity enhance cells migration and deposition; support cells organization and thus promote effective repair of osteochondral defects.

## Conclusion

It was shown that the nanocomposite polymer implant covered with the biopolymer stimulated regeneration of osseo tissue. Bioactive, resorbable polymeric nanocomposite materials containing ceramic nanoparticles are interesting implant materials which fulfil requirements of the regenerative medicine. In the next step of analysis of the osteointegration and stimulation of osseo-tissue regeneration process histochemical studies ought to be performed.



**FIG. 3. SEM microphotograph of joint between the implant and the bone tissue (a), Average EDS analysis of the implant cover by tissue (b).**

## References

- [1] Xiaoxiao Cai, Yunfeng Lin, Guomin Ou, En Luo, Yi Man, Quan Yuan, Ping Gong, Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system, *Cell Biology International* 31 (2007) 776-783.
- [2] Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS: A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 2003, 23:37-49.
- [3] Schaefer D, Martin I, Shastri P, Padera RF, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials* 2000, 21:2599-2606.
- [4] Caterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR, Tuan RS: Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *J Biomed Mater Res* 2001, 57:394-403.
- [5] Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA: Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 2000, 21:571-580.
- [6] Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, Griffith LG, Landeen LK, Ratcliffe A: A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials* 2002, 23:4739-4751.
- [7] A. Frączek-Szczypta, E. Stodolak, A. Wiecheć, M. Błażewicz: Preliminary investigations of polylactide-based nanocomposites as potential materials for bone cells proliferation, *Engineering of Biomaterials* 2010, 96-98: 1-3.



# INFLUENCE OF SURFACE AND STRUCTURAL PROPERTIES ON THE INITIAL RELEASE OF RISPERIDONE FROM POLYMERIC DRUG CARRIERS

ARTUR TUREK<sup>1\*</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
KATARZYNA JELONEK<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>,  
JOANNA WALICHIEWICZ<sup>1</sup>, KATARZYNA KRZEMIŃSKA<sup>1</sup>,  
ANNA SMOLA<sup>2</sup>, MONIKA MUSIAŁ-KULIK<sup>2</sup>, ANDRZEJ MARCINKOWSKI<sup>2</sup>, MARCIN LIBERA<sup>2</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

\*MAILTO: A.TUREK75@GMAIL.COM

## Abstract

*In this work, implantable drug formulation with risperidone on the basis of poly(L-lactide-co-glycolide) (L-PLGA) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) (D,L-PLGA) as drug carriers was developed. The influence of surface and structural properties on the initial release of risperidone during the first twenty four hours was determined. In this aim, high-performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, scanning electron microscope and atomic force microscope were used. Significant differences between L-PLGA and D,L-PLGA matrices in all analyzed data were noted. The burst effect was not revealed for any of the studied polymers, however the released drug was almost five times larger for D,L-PLGA matrices. The L-PLGA copolymer revealed a significantly longer average length of the lactidyl and glycolidyl blocks than D,L-PLGA. Moreover, various characters of surface for analyzed matrices were shown, i.e. in case of L-PLGA the surface was porous and in case of D,L-PLGA it was nonporous. Undoubtedly, there were dependences between risperidone's initial release and the topography and the structure of polymeric matrices. We suppose that the larger drug release for L-PLGA was more associated with surface properties and thus structure of matrices. The obtained results showed the great potential of both polymers and possibility to choose the optimal polymer.*

**Keywords:** risperidone, implantable drug carriers, poly(L-lactide-co-glycolide), poly(D,L-lactide-co-glycolide), initial release

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 144-146]

## Introduction

According to the literature data schizophrenia affects a significant part of the world population, i.e. the range of 0.3-0.7% [1,2]. A lot of neuroleptics in various formulations have found the application in the treatment of schizophrenia [3-6]. One of them was risperidone, clinically used since the late 80's [7,8]. In the last two decades, such formulations containing risperidone as conventional oral tablets and orodispersible tablets, syrups and long-acting injections were proposed to increase the bioavailability of risperidone and to decrease its widely understood side effects [9-12]. Regard-

less of the point of view, the above-mentioned formulations possess the smaller or larger drawbacks. The biggest drawback of oral formulations seems to be the need of regular daily applications. An alternative to the traditional drug formulations are various long-acting injections. The commercially available medical product containing risperidone in the form of a long-acting injection includes the encapsulated microspheres composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (D,L-PLGA) and must be applied every two weeks for most patients. In case of this medical product the main release of risperidone begins in the 3<sup>rd</sup> week, lasts from the 4<sup>th</sup> to 6<sup>th</sup> week and ends in the 7<sup>th</sup> week [13]. However, due to the fact that the microspheres are suspended in an aqueous solution, the drug's administration may be accompanied by pain. Moreover, in the event of any clinical complications microspheres cannot be removed.

In our studies, an implantable drug formulation with risperidone on the basis of poly(L-lactide-co-glycolide) (L-PLGA) and D,L-PLGA as drug carriers will be developed. The main aim of the performed studies on a novel formulation is obtaining a medical product which will be applied less frequently and risperidone will be released faster than in the 4<sup>th</sup> week and longer than for 7 weeks in comparison with a commercial product. However, in this work, at the current stage of studies, the influence of surface and structural properties on the initial release of risperidone from polymeric matrices and the risk of the burst effect will be determined.

## Materials and methods

The matrices (10 mm diameter) were obtained from two high molecular copolymers, i.e. L-PLGA 85:15 (100 000 Da) and D,L-PLGA 85:15 (90 300 Da) by solution casting method. In this study, five matrices obtained from L-PLGA with an average weight equal to 60.74±13.60 mg and five matrices from D,L-PLGA with an average weight equal to 71.22±2.47 mg were used. The copolymer was synthesized at Centre of Polymer and Carbon Materials of Polish Academy of Sciences in Zabrze in bulk with the use of Zr(Acac)<sub>4</sub> as a low toxic initiator according to the previously developed methodology [14,15].

The matrices containing 10% of risperidone (Teva Kutno S.A.) were incubated in a PBS buffer (pH 7.4) in the ratio of 15 mg of matrix: 1 ml of PBS during 24 hours under constant agitation (240 revs per minute) at the temperature of 37°C. After this period the buffer was examined for the presence of risperidone. Surface and structural properties of polymeric matrices were determined before their incubation in the PBS buffer.

Determination of risperidone concentration was done by high-performance liquid chromatography – HPLC using a column oven (L-2450, VWR Hitachi, Merck), a UV detector (L-2355 diode array detector, VWR Hitachi, Merck) and Elite LaChrom chromatograph (VWR Hitachi, Merck).

The composition and chain structure of used copolymers (the average length of the glycolidyl ( $I_{GG}$ ) and lactidyl blocks ( $I_{LL}$ ), randomization ratio (R)) were determined by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). <sup>1</sup>H NMR data were recorded at 600 MHz and <sup>13</sup>C NMR at 125 MHz using AVANCE II Ultra Shield Plus Bruker 600 MHz spectrometer and a 5-mm sample tube. DMSO-d<sub>6</sub> was used as a solvent.

The morphological study of the matrices' surface was performed by a scanning electron microscope (SEM) and an atomic force microscope (AFM). SEM Quanta 250 FEG (FEI Company) was employed in this study. Prior to observation the samples were sputter coated with a 3 nm layer of gold and investigated at low vacuum. The accelerating voltage

was 5 kV while scanning. AFM imaging was performed using MultiMode 3 (di-Veeco, CA) working in the tapping mode under atmospheric conditions. Before measurements, the matrices were dried on air at room temperature in the laminar box and then under reduced pressure. All AFM images were processed using the software package WSxM (Nanotec Electronica) [16].

## Results and discussions

During risperidone release from the implantable biodegradable formulations various unfavorable phenomena may take place. One of them is burst effect, widely described in literature for other drugs and various drug carriers [17,18]. In this work, novel formulations which may release risperidone longer than for 7 weeks will be developed. In this aspect, the limitation or elimination of the burst effect is significantly important. On the one hand, uncontrolled release of drug substance may influence toxic effect in vivo. On the other hand, excessive release of drug substance directly affects the dose reduction in the polymeric matrices.

Undoubtedly, there are dependences between risperidone's initial release and the topography and structure of polymeric matrices. In this study it was confirmed. Significant differences between L-PLGA and D,L-PLGA matrices in the level of risperidone release, SEM and AFM images and NMR data were observed.

The initial risperidone release was not very significant, so the burst effect did not occur in any of the studied polymers. However, significant differences between copolymers in released drug amount were noted - in case of L-PLGA,  $30.94 \mu\text{g} \pm 3.16$  (i.e. 0.51%) of risperidone was released, while in case of D,L-PLGA, the amount of  $167.07 \pm 19.25 \mu\text{g}$  (i.e. 2.35%) of risperidone was noted after the first day of the matrices' incubation in the PBS buffer. The level of risperidone release during the first twenty four hours may give information about the amount of substance which was not incorporated into matrix. It should be emphasized that in fact during the first twenty four hours the hydrolytic degradation does not take place in case of high molecular mass aliphatic polyesters. In this period mainly surface phenomena may decide on risperidone release. However, surface properties are largely a reflection of structural properties.

In the NMR study, significant differences in the average  $I_{LL}$  and  $I_{GG}$  blocks as well as in R between L-PLGA and D,L-PLGA matrices were shown. The L-PLGA copolymer revealed significantly longer average  $I_{LL}$  and  $I_{GG}$  blocks than D,L-PLGA (TABLE 1). The average  $I_{LL}$  and  $I_{GG}$  blocks allowed determining the kind of the copolymers' structure. Considering that the block structure of polymers occurs at the value of randomization ratio equal to 0, the semi-block structure at the value of 0.5 and the random structure at the value of 1, the structure of L-PLGA was more blocky than that of D,L-PLGA (TABLE 1).

On the basis of average  $I_{LL}$ ,  $I_{GG}$  blocks and R it is difficult to clearly explain how the matrix structure influenced the initial release of risperidone from L-PLGA and D,L-PLGA matrices. Therefore, it is not known on the basis of the NMR study why the initial release of risperidone from the L-PLGA matrix was noted on a significantly lower level. More explanations may be obtained from the analysis of surface properties.

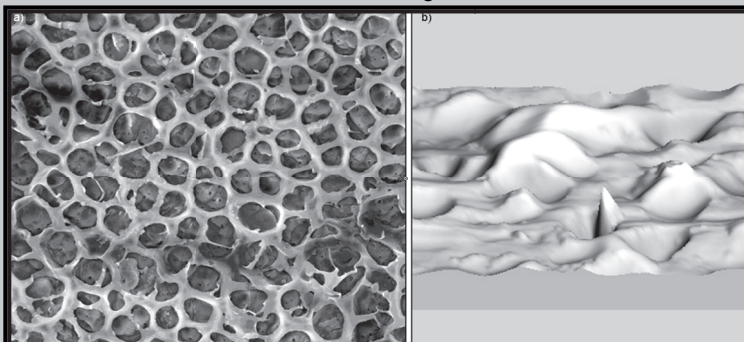
SEM and AFM images reflected significant differences in the morphology of the analyzed surface between the L-PLGA and D,L-PLGA matrices.

**TABLE 1. Structure of L-PLGA and D,L-PLGA determined by NMR study before incubation in the PBS buffer. Content of lactidyl ( $F_{LL}$ ) and glycolidyl ( $F_{GG}$ ) segment; the average length of lactidyl ( $I_{LL}$ ) and glycolidyl ( $I_{GG}$ ) blocks; R – randomization ratio.**

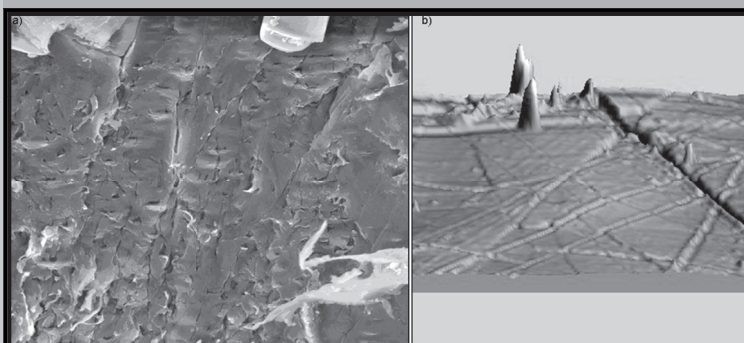
Copolymers	$F_{LL}$ [%]	$F_{GG}$ [%]	$I_{LL}$	$I_{GG}$	R
L-PLGA	85	15	11.34	2.08	0.33
D,L-PLGA	85	15	8.8	1.6	0.43

In case of L-PLGA, the SEM image showed strong porosity of the matrix. The pores were uniformly distributed and possessed oval shape (FIG.1a). The AFM analysis of the matrix revealed numerous hills and hollows on the surface, which might be related to the presence of the pores (FIG. 1b). In our opinion, generally porosity may influence initial release in various ways. It may be confirmed only in an experimental way. Pores localized inside the matrix may be responsible for entrapping drugs and influence the release of drugs in higher amount at the later stage of degradation. However, the pores localized on the surface which do not contain drug or contain little amount of drug may cause insignificant risperidone release at the initial stage of degradation. This phenomenon might take place in case of the studied L-PLGA matrices which revealed 0.51% release of risperidone during the first twenty four hours.

The observed porous surface was formed during the obtaining of matrices. It seems that it is a result of copolymer composition. The effect of solvent addition during processing might also result in differences between surface of polymers with various structure. Differences in solvent induced conformational and morphological changes on the surface of L-PLGA and D,L-PLA were determined. Other authors showed that the contact angle increases after solvent treat-



**FIG. 1. Morphology of the L-PLGA matrix containing risperidone before incubation in the PBS buffer: SEM image (magnification x 9356) (a), AFM height 3D image ( $14.5 \mu\text{m} \times 14.5 \mu\text{m} \times 1.13 \mu\text{m}$ ) (b).**



**FIG. 2. Morphology of the D,L-PLGA matrix containing risperidone before incubation in the PBS buffer: SEM image (magnification x 9402) (a), AFM height 3D image ( $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m} \times 1.13 \mu\text{m}$ ) (b).**



ment, so the solvent has tremendous effect onto the surface characteristics of the polymer. The increase in the water contact angle is also in a relationship with the segregation of the methyl hydrophobic groups at the polymer surface. It was also reported that the glass transition temperature ( $T_g$ ) has a great influence onto the surface segregation of methyl groups – polymer with lower  $T_g$  value showed higher surface restructuring extent in comparison with polymers with higher  $T_g$  value. Thereafter there might be the differences in surface morphology between L-PLGA and D,L-PLGA, which differ in glass transition temperature [19].

The matrices deprived of pores, i.e. D,L-PLGA (FIG.2), revealed the release of risperidone which was almost five times larger. The SEM (FIG.2a) and AFM (FIG. 2b) images of the D,L-PLGA matrix showed also a solid surface composed of morphologic elements with various sizes. D,L-PLGA is a more amorphous material as a result of the atactic structure of the polylactide segments. Copolymer chains were distributed irregularly which might have influence on the creating of the solid surface. Ipso facto the surface of interaction and the adhesion forces between the molecules of risperidone and D,L-PLGA might be lower. We suppose that the higher release of risperidone is closely associated with this feature. Moreover, the increased chain mobility which characterizes amorphous polymers may favor easier drug release from the outer part of matrix.

## Conclusions

Concluding, none of the studied polymers exhibited the burst release, however in case of L-PLGA lower amount of drug released during first twenty four hours was noted than in case of D,L-PLGA. However, generally D,L-PLGA is a more amorphous than L-PLGA. D,L-PLGA will degrade faster, which may influence bigger release of risperidone in a shorter period. In turn, more crystalline L-PLGA may influence longer and less even release of risperidone. A proper and the simplest way to avoid the burst effect in case of a medical product seems to be washing the implant during its preparation. However, this will affect the decrease in risperidone dose. It seems that there is a strong correlation of the surface and structural properties with the level of the released drug. A 10% content in the D,L-PLGA matrix might be too high from the point of view of the higher amount of released drug. It is possible that a lower dose (e.g. 5% or 7.5%) will be more optimal for this copolymer. Then, adhesion forces between the molecules of risperidone and D,L-PLGA may be sufficient for the lowering of released drug in the initial phase. Much lower amount of drug was released from L-PLGA, which found a reflection in different surface morphology, i.e. the presence of pores. As was mentioned before, pores localized inside the matrix may be responsible for entrapping drugs and influence the release of drugs in higher amount in the later stage of degradation. However, the pores localized on the surface which do not contain drug or contain little amount of drug cause insignificant risperidone release in the initial stage of degradation. Undoubtedly, further study is necessary to determine the whole drug release profile, however the obtained results showed the lack of burst effect for both of the studied polymers, so they exhibited potential in developing implantable delivery system of risperidone. Moreover, they showed different drug release in the first twenty four hours, which gives the possibility to choose the optimal polymer for the treatment and demanded initial dose.

## Acknowledgments

This work was financially supported by Medical University of Silesia, grant no KNW-1-023/P/2/0.

The authors thank Teva Kutno S.A. for providing the drug substance, i.e. risperidone.

## References

- [1] [http://www.who.int/mental\\_health/management/schizophrenia/en/](http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/).
- [2] McGrath J., Saha S., Chant D., Welham J.: Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 30 (2008) 67–76.
- [3] Asenjo Lobos C., Komossa K., Rummel-Kluge C., Hunger H., Schmid F., Schwarz S., Leucht S.: Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* 11 (2010) CD006633.
- [4] Leucht C., Heres S., Kane J.M., Kissling W., Davis J.M., Leucht S.: Oral versus depot antipsychotic drugs for schizophrenia. A critical systematic review and meta-analysis of randomised long-term trials. *Schizophr Res* 127 (2011) 83–92.
- [5] Leucht S., Tardy M., Komossa K., Heres S., Kissling W., Davis J.M.: Maintenance treatment with antipsychotic drugs for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* 5 (2012) CD008016.
- [6] Miyamoto S., Miyake N., Jarskog L.F., Fleischacker W.W., Lieberman J.A.: Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatr* 10 (2012) 1038/2012.47.
- [7] Roose K., Gelders Y., Heylen S.: Risperidone (R64 766) in psychotic patients. A first clinical therapeutic exploration. *Acta Psychiatr Belg* 88 (1988) 233–241.
- [8] Castelão J.F., Ferreira L., Gelders Y.G., Heylen S.L.: The efficacy of the D2 and 5-HT2 antagonist risperidone (R 64,766) in the treatment of chronic psychosis. An open dose-finding study. *Schizophr Res* 2 (1989) 411–415.
- [9] Gutierrez R., Lee P.I., Huang M.L., Woestenborghs R.: Risperidone: effects of formulations on oral bioavailability. *Pharmacotherapy* 17(1997) 599–605.
- [10] Kane J.M., Eerdekens M., Lindenmayer J.P., Keith S.J., Lesem M., Karcher K.: Long-acting injectable risperidone: efficacy and safety of the first long-acting atypical antipsychotic. *Am J Psychiatr* 160 (2003) 1125–1132.
- [11] Tassaneeyakul W., Kumar S., Gaysonsiri D., Kaewkamson T., Khuroo A., Tangsucharit P., Phunikhom K., Vannaprasaht S., Kanjanawart S., Rao Thudi N., Jain R., Reyar S., Monif T.: Comparative bioavailability of two risperidone orodispersible tablet products after single dose administration. *Int J Clin Pharm Th* 48 (2010) 614–620.
- [12] Huang M., Shen-Tu J., Hu X., Chen J., Liu J., Wu L.: Comparative fasting bioavailability of dispersible and conventional tablets of risperidone: a single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy male chinese volunteers. *Clin Ther* 34 (2012) 1432–1439.
- [13] [http://www.ema.europa.eu/docs/pl\\_PL/document\\_library/References\\_document/Risperdal\\_Consta\\_30/WC5000\\_08170.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/References_document/Risperdal_Consta_30/WC5000_08170.pdf).
- [14] Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J.: Sposób wytwarzania bioresorbowalnych polimerów. Opis patentowy PL 191846 B1 (2000).
- [15] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1: Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(Acac)<sub>4</sub>. *Macromolecules* 34 (2001) 5090–5098.
- [16] Horcas I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J.M., Colchero J., Gómez-Herrero J., Baro A.M. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* 78 (2007) 013705.
- [17] Trindade R.A., Kiyohara P.K., de Araujo P.S., Bueno da Costa M.H.: PLGA microspheres containing bee venom proteins for preventive immunotherapy. *Int J Pharm* 423 (2012) 124–133.
- [18] Rafati A., Boussahel A., Shakesheff K.M., Shard A.G., Roberts C.J., Chen X., Scurr D.J., Rigby-Singleton S., Whiteside P., Alexander M.R., Davies M.C.: Chemical and spatial analysis of protein loaded PLGA microspheres for drug delivery applications. *J Control Release* (2012) [Epub ahead of print].
- [19] Thanki P.N., Dellacherie E., Six J.L.: Surface characteristics of PLA and PLGA films. *Appl Surf Sci* 253 (2006) 2758–2764.



# DEGRADATION OF COMPOSITES BASED ON RAW MATERIALS FOR ORTHOPEDIC EQUIPMENT

BARBARA SZARANIEC\*, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ,  
EWA STODOLAK-ZYCH

AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF  
MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATE-  
RIALS, KRAKOW

\*MAILTO: SZARAN@AGH.EDU.PL

## Abstract

Eco-composites based on natural raw materials such as polylactide and plant fibres (e.g. flax, hemp, jute) show many important features which enable them to be used as potential materials for biomedical engineering. Availability of the raw materials and low costs of production, capability to enhance mechanical parameters and also controlled time of degradation in the environment allow considering them as materials for rehabilitation equipment, orthopedic supplies or materials for medical packages. Such materials due to the presence of the natural fibres provide higher comfort during their utilization and then they undergo safe biodegradation which is non-harmful for the environment [1,2].

The work presents attempts on fabrication of composites based on polylactide (PLA, Ingeo 3051D, Nature works, USA) reinforced with short flax and jute fibres. The fibres were mechanically comminuted to the length of 1÷2 mm. Preparation of PLA/fibres mixture took part in two stages. The first one consisted in drying of the polymer granulate and the fibrous filler at 60°C for 2 h. The second stage the granulate/fibres mixture was homogenized using vertical screw injection moulding machine (Multiplas). The obtained mixture was mechanically comminuted with a laboratory grinder (Testchem). Volume fraction of the fibres was not higher than 5 %. The granulates were used to prepare PLA/natural fibres composites in the form of paddle-shaped samples (according to PN-EN ISO 527) by the injection method. The injection took place at 165°C and pressure of 80 kg/cm<sup>2</sup>. The samples were subjected to hydrolytic degradation tests (incubation in distilled water at 37°C, 15 weeks) and biological degradation (composting in an eco-composter, TERMO-410 with the addition of Radvit activator which contains composting bacteria and selected fungi cultures which support biodegradation and accelerate degradation of organic wastes, 15 weeks). The effect of the degradation environment on the composite material was determined on the basis of changes of its mechanical properties (tensile strength, Young's modulus) using an universal testing machine (Zwick 1453). The degradation process was monitored by FT-IR spectroscopy of the composite samples (transmission method, BioRAD 60FT). Changes related to the polymer chain degradation were assessed on the basis of viscosimetric measurements (Hoppler method).

The carried out investigations proved, that during both the composting and the incubation in water a gradual degradation of the material takes place. Its visual effect was decrease of the tensile strength of the composites for about 70% for PLA/5% jute and for

c.a. 10% for PLA/5% hemp and their Young's modulus for about 25 % for PLA/5% jute and for c.a. 10% for PLA/5% hemp. The changes were caused by decrease of molecular weight (*M<sub>n</sub>*) of the polymer matrix from 100 to 28 kDa for PLA/5% hemp, and from 136 to 48 kDa for PLA/5% jute. The change of the polymer structure was faster in the case of degradation in water environment. This effect was related to facilitated migration of medium (water) inside the material and possibility of washing out and transport of products of the polymer chain disintegration. Additionally, the present fibrous phase which is characterized by high water absorbability may become a reservoir of both the medium and the degradation products. Biodegradation in the compost heap was slower and it was an example of synergic effect of hydrolytic degradation and biodegradation caused by the microorganisms. This process could be observed on the FT-IR spectra recorded during degradation in the compost heap, where longer composting time led to increasing disproportion between bands indicating increasing fraction of hydroxyl, carboxyl and carbonyl groups in relation to groups characteristic for PLA chain. In the case of biodegradation the process progress is related to such variable factors as: amount and type of the bacteria and fungi cultures, humidity and temperature.

In conclusion, it may be stated that the proposed PLA/natural fibres composite materials are an alternative solution for many fields of biomedical engineering especially for rehabilitation and orthopedic provision.

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 147]

## Acknowledgments

This work has been financially supported from the project no. POIG.01.03.01-00-092/08 by European Regional Development Fund and Polish Budget Funds.

## References

- [1] Shah A. A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S.: Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 26 (2008) 246-265.
- [2] Chłopek J., Morawska-Chochół A., Szaraniec B.: The influence of the environment on the degradation of polylactides and their composites, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 43 (2010) 72-79.

## THE INFLUENCE OF THE DEGRADATION PROCESS ON THE PLA/TCP LOCKING BOLT THREAD STRENGTH AS A PART OF INTRAMEDULLARY LOCKING NAIL SYSTEM

K.GRYN<sup>1</sup>, B.SZARANIEC, M.ZIĄBKA, A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J.CHŁOPEK

AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIAL SCIENCES AND CERAMICS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND  
\*MAILTO: KGRYN@AGH.EDU.PL

### Abstract

*Intramedullary nailing has received increased attention for the treatment of distal femoral fractures. There are many types of nailing systems commonly used. Among them there is locked intramedullary nailing, which combines closed nailing with a special locking piece (bolt), which expands distal part of a nail and anchoring it when a central screw is tightened. Compared to other interlocking nail systems it is very effective and not so invasive way of fractured long bone treatment. However, it is not perfect and has one major disadvantage related to material (metal) and necessity of removing all parts of the system after the bone is recovered. The biggest issue is connected with the locking piece removal. That is why there was a need to find a material for this piece which is biodegradable and strong enough to maintain its mechanical function at the same time.*

*Poly-L-lactide (PLA) is nowadays one of the most used bioabsorbable materials. Unfortunately, this polymer may not meet some application requirements due to inadequate mechanical properties and its degradation characteristics. One of the easiest ways to overcome these obstacles is to introduce an inorganic phase into the polymer matrix to create a composite.*

*In this article a production method of a biodegradable composite (PLA/TCP, 90/10) locking piece of an interlocking intramedullary nail called "OLIVE" and the influence of degradation process in simulated physiological conditions (H<sub>2</sub>O, PBS) on its mechanical properties is shown. Main stress was placed on the inner thread strength to discover how it changes with time. A special device for mechanical testing machine imitating working conditions was fabricated.*

*Based on SEM observations, pH and electric conductivity monitoring after 14 days no degradation was found. However, mechanical testing shown, that after incubation for such period of time the material was more ductile. Instead of cracking, what was observed for not incubated samples, they changed their shape during the testing process. Nevertheless, it didn't radically influence on the inner thread strength and didn't change mechanical function of the olive. No inner thread destruction was discovered contrary to a metallic screws which in all cases were broken. Preliminary results indicate that proposed composite*

*and an implant made of this material might be used as a locking piece in a locked intramedullary nailing system.*

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 148]

## INFLUENCE OF THIN FILMS OF BIOGLASS AND HYDROXYAPATITE MIXTURE DEPOSITED BY PLD METHOD ON BIOACTIVITY OF FOAM TITANIUM IMPLANTS

W.MRÓZ<sup>1</sup>, B.BUDNER<sup>1</sup>, R.ZAŁĘCZNY<sup>1</sup>, A.BOMBALSKA<sup>1</sup>, K.NIEDZIELSKI<sup>2</sup>, M.ŁĄCZKA<sup>3</sup>, A.ŚŁÓARCZYK<sup>3</sup>, K.CHOLEWA-KOWALSKA<sup>3</sup>, T.E.L.DOUGLAS<sup>4</sup>, D.SCHWARZE<sup>5</sup>

<sup>1</sup> MILITARY UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF OPTOELECTRONICS,

2 GEN.S.KALISKIEGO STR., 00-908 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS,  
POLISH MOTHER MEMORIAL HOSPITAL,  
281/289 RZGOWSKA STR., 93-338 LODZ, POLAND

<sup>3</sup> AGH- UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKÓW, POLAND

<sup>4</sup> GHENT UNIVERSITY,  
POLYMER CHEMISTRY AND BIOMATERIALS (PBM) GROUP,  
CAMPUS STERRE, BUILDING S4,  
KRIJGSLAAN 281, 9000 GENT, BELGIUM

<sup>5</sup> SLM SOLUTIONS GMBH, ROGGENHORSTER STRASSE 9C,  
23556 LÜBECK, GERMANY

### Abstract

*The introduction of different bioelements into the structure of hydroxyapatite exerts a positive influence on the growth of new bone tissue. One such useful bioelement is silica, which possesses antibacterial properties and also acts as a factor regulating bone mineralization through stimulation of DNA to synthesize osteoblasts.*

*Results of investigations into integration of foam titanium implants (FTI), with rabbit bone are presented. Two groups of implants were investigated: clean titanium implants produced by selective laser melting and FTI coated with a thin film of hydroxyapatite (HA) mixed with 10 wt. % of bioglass (BG) of A2 type (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>). Analysis of histopathology of implants' integration with bone were performed by staining using the triple chromatographic method of Masson - Goldner, planimetric analysis using the Kruskal - Wallis test, an ANOVA test and microtomography. Application of layers of the type HA+GH showed superior integration with bone than uncoated titanium implants.*

**Key words:** PLD, foam titanium implants, in vivo, HA, bioglass

[Engineering of Biomaterials, 116-117, (2012), 148]

# THE ADHESION AND GROWTH OF HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON TITANIUM MODIFIED WITH GOLD MICROPARTICLES AND POLY(ETHYLENE IMINE)

MARTIN PARIZEK<sup>1</sup>, TOMAS BASE<sup>2</sup>, MARTIN HRUBY<sup>3</sup>, VERA LISA<sup>1</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACAD. SCI. CR, 1083 VIDENSKA STR, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC; E-MAIL: PARIZEK.M@SEZNAM.CZ, LUCY@BIOMED.CAS.CZ

<sup>2</sup>INSTITUTE OF INORGANIC CHEMISTRY, ACAD. SCI. CR, 250 68 HUSINEC-REZ 101, E-MAIL: TBASE@IIC.CAS.CZ

<sup>3</sup>INSTITUTE OF MACROMOLECULAR CHEMISTRY, ACAD. SCI. CR, 2 HEYROVSKY SQ., 162 06 PRAGUE 6; E-MAIL: MHRUBY@CENTRUM.CZ

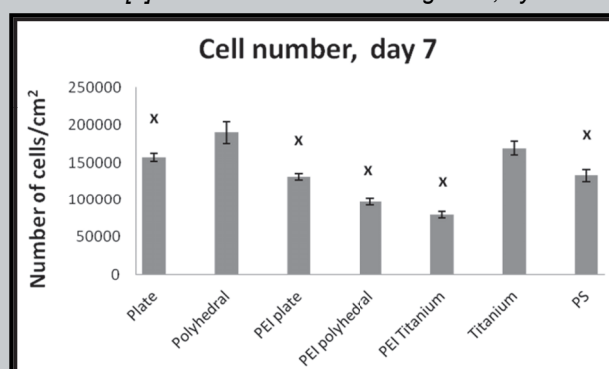
## Abstract

*Metallic materials are indispensable for construction of surgical implants, particularly those designed for load-bearing application, such as the bone-anchoring parts of big joint replacements. For good osteointegration, long-term function, durability and also mechanical and chemical resistance of the implant, the physical and chemical properties of the material surface are of a great importance. These properties can be favorably influenced by coating the bone-anchoring parts of the implants with appropriate biocompatible and bioactive films. Therefore, in this study, we have investigated the adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on titanium substrates coated with films made of gold microparticles and/or poly(ethylene imine) (PEI).*

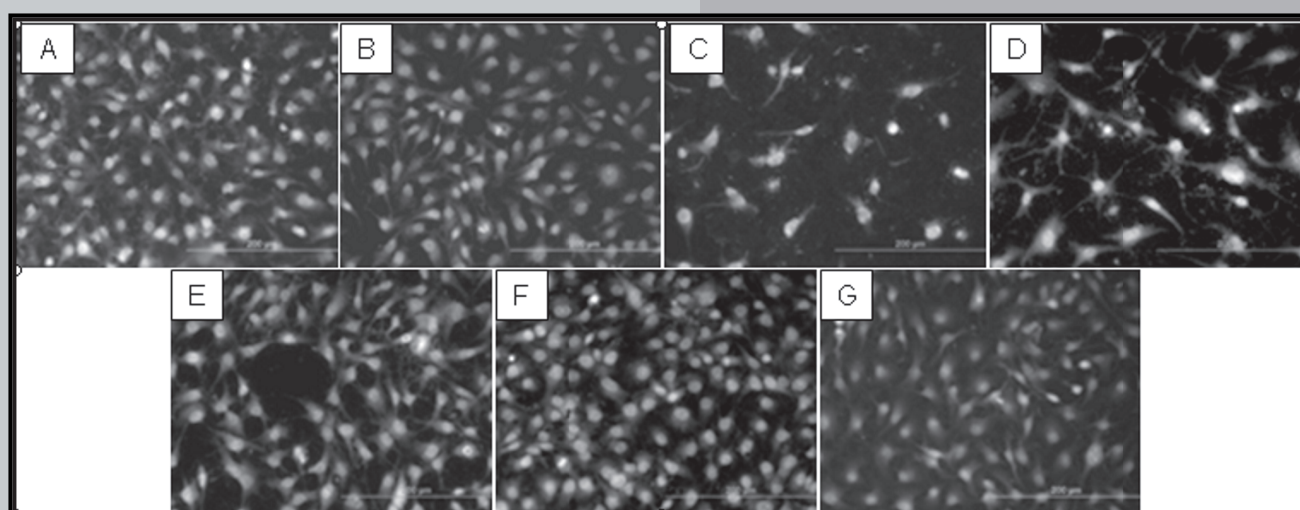
*Gold microparticles were chosen for good biocompatibility of gold and absence of its cytotoxicity, which has been proved by numerous studies performed in vitro and in vivo [1,2]. When deposited on the material*

*surface, these microparticles provide this surface with microstructure, which has been reported to enhance the osteogenic differentiation of bone-derived cells. On the other hand, the material surface microroughness has dual effect on the cell adhesion, spreading and proliferation – some studies reported the enhancement, other the reduction of these events (for a review, see [3,4]). This suggests that not only the size of the microscale irregularities, but also their shape should be taken into account. Therefore, in our study, gold microparticles were used in the form of plates or polyhedral crystals [5]. These microparticles were deposited on square samples of Ti (1x1 cm, thickness 1 mm) and annealed with a hydrogen flame.*

*As for PEI, this polymer has been used as precursor base layer for further functionalization of metallic substrates, particularly with polyelectrolyte multilayer films [6] or biomolecules such as gelatin, hyaluronan*



**FIG. 1.** Number of human osteoblast-like MG 63 cells on day 7 after seeding on titanium modified by gold microparticles (Plate), gold polyhedral crystals (Polyhedral), titanium modified by gold microparticles with PEI coating (PEI plate), gold polyhedral crystals with PEI coating (PEI polyhedral), titanium with PEI coating (PEI Titanium), pure titanium (Titanium). As a reference material, standard cell culture polystyrene dish (PS) was used. Mean  $\pm$  SEM from 3 independent samples for each experimental group. ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Statistical significance: x:  $p \leq 0.05$  in comparison with Polyhedral.



**FIG. 2.** Morphology of human osteoblast-like MG 63 cells on day 3 after seeding on titanium modified by gold microparticles (A), gold polyhedral crystals (B), gold microparticles with PEI coating (C), gold polyhedral crystals with PEI coating (D) and PEI coating (E). As reference materials pure titanium (F) and standard cell culture polystyrene dish (G) were used. Stained with Texas Red C2-maleimide and Hoechst #33342. Microscope Olympus IX 51, obj. 20, digital camera DP 70. Bar = 200  $\mu$ m.



or chitosan [7,8]. Other reason for the PEI deposition was creation of an intermediate layer which would compensate the differences in mechanical properties (e.g., hardness, toughness, specific weight) between a metallic implant and bone tissue. PEI was deposited either on pure or on gold microparticle-coated Ti samples.

The materials were sterilized with 70% ethanol (1 hour), inserted into 24-well polystyrene plates (well diameter 1.5 cm; TPP, Switzerland) and seeded with human osteoblast-like MG 63 cells (30 000 cells/well, i.e. 17 000 cells/cm<sup>2</sup>). Each well contained 1.5 ml of a medium DMEM with 10% of fetal bovine serum and 40 µg/ml of gentamicin. On days 1, 3 and 7 after seeding, the cell number and morphology were evaluated. For evaluating the cell number, the cells were trypsinized and counted in Bürker hemocytometer. For evaluating the cell morphology, i.e. the cell shape and the size of cell spreading area, the cells were fixed with 70% ethanol (-20°C, 10 min) and stained with a combination of fluorescence dyes Texas Red C2-maleimide, which stains the cell membrane and cytoplasm, and Hoechst #33342, which stains the cell nuclei. The microphotographs of cells were taken using an Olympus IX 51 microscope equipped with a DP 70 digital camera, and the cell spreading area was measured on these pictures using a software Atlas (Tescan, Brno, Czech Rep.)

One day after seeding, the highest number of initially adhered cells was found on the surface modified by gold polyhedral crystals. This trend was the same on days 3 and 7 after seeding (FIG.1,2). However, the cell number on Ti modified with gold plates was significantly lower than on Ti with polyhedral crystals. Nevertheless, the numbers of cells on Ti samples coated with gold microparticles without PEI were significantly higher than on PEI-coated samples. Also the cell spreading areas were significantly larger on the samples without PEI. The cells on the samples without PEI were mostly polygonal, while the cells on PEI-coated samples were of star-like appearance, i.e. with multiple long protrusions (FIG.2). This is in accordance with findings published by other authors, documenting cytotoxic effects of PEI, particularly that of a high molecular weight [6], which was also used in our study (m.w. 750 kDa). Nevertheless, this cytotoxicity was considerably reduced by further functionalization of PEI with biomolecules, such as gelatin, hyaluronan or chitosan [7,8].

Thus, it can be concluded that the modification of titanium plates by gold microparticles supported the adhesion and growth of MG 63 cells. In this context, the polyhedral crystals were more advantageous than plates. The effects of PEI coatings on cell behavior need further investigation.

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117,(2012), 149-150]

## Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. P108/10/1106).

## References

- [1] Gannon C.J., Patra C.R., Bhattacharya R., Mukherjee P., Curley S., J. Nanobiotechnology 6: 2, 2008.
- [2] Nagesha D., Laevsky G.S., Lampton P., Banyal R., Warner C., DiMarzio C., Sridhar S., Int. J. Nanomedicine 2: 813-819, 2007.
- [3] Vagaska B., Bacakova L., Filova E., Balik K. Physiol. Res. 59: 309-322, 2010.
- [4] Vandrovcova M., Bacakova L. Physiol. Res. 60: 403-417, 2011.
- [5] Base T., Bastl Z., Slouf M., Klementova M., Subrt J., Vetushka A., Ledinsky M., Fejfar A., Machacek J., Carr M.J., Londesborough M.G.S. J. Phys. Chem. C 112: 14446-14455, 2008.
- [6] Brunot C., Ponsonnet L., Lagneau C., Farge P., Picart C., Grosgeat B. Biomaterials 28: 632-640, 2007.
- [7] Zhong X., Lu Z., Valtchev P., Wei H., Zreiqat H., Dehghani F. Colloids Surf B Biointerfaces 93: 75-84, 2012
- [8] Liu Z.M., Lee S.Y., Sarun S., Moeller S., Schnabelrauch M., Groth T. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 21: 893-912, 2010.

.....

# BIOCOMATIBILITY STUDY OF BOC POLYMER MESH ENRICHED WITH HAP AND TCP COVERED BY PCL FIBRES

E.MENASZEK<sup>1,2</sup>, A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA<sup>3</sup>, Z.DRACZYŃSKI<sup>4</sup>, M.BOGUN<sup>4</sup>, E.STODOLAK-ZYCH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY – COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW, POLAND

<sup>3</sup>DEPARTMENT OF ANATOMY, ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, KRAKOW, POLAND

<sup>4</sup>DEPARTMENT OF MATERIAL AND COMMODITY SCIENCES AND TEXTILE METROLOGY, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

## Abstract

*The study was conducted in order to determine the biocompatibility of polymer mesh based on BOC and enriched with HAp or TCP covered by PCL sub-micrometric fibres. Human osteoblast cell line NHOst was cultured in standard conditions on disk-shaped polymer samples. Interactions between materials and cells were examined through microscopic observation of cells' adhesion and morphology, and tests of viability/proliferation and cytotoxicity. The study proved the biocompatibility of all examined materials, though the surface of TCP enriched polymer didn't promote the adhesion of cells.*

**Key words:** polymer mesh, HAp, TCP, osteoblasts NHOst

[Engineering of Biomaterials, 116-117,(2012), 151-152]

## Introduction

Polymers are widely used as a material for implants because of their flexibility, plasticity and possibility of modification. Natural biopolymers such as chitin, alginate and cellulose were used to obtain the new implant materials. These polymers in form of fibres allow the preparation of various types of composites which have features (e.g. anisotropy) different from those characteristic for typical natural tissues [1]. Many efforts have been made to improve the biocompatibility of different polymer materials, mainly by modifying the topography and physicochemical properties to promote cell activity at the surface of implants. There is a growing interest in search of new materials that allows air, liquids or cells to pass through. The objective of the study was to estimate the effect of such permeable polymer meshes and their surface modification achieved by the addition of HAp or TCP on adherence and viability of osteoblasts. Biopolymer fibres based on chitin butyric-acetic copolyesters (BOC) are characterized by the presence of various side groups. These active chemical groups could entrap nanoparticles such as TCP, HA into the polymer chain [2]. High wettability of BOC fibres could be modified by covering biopolymer-mesh by submicrometric hydrophobic fibres with PCL (poly-ε-caprolactone). Domein microstructure of fibrous composite could be suitable to adhesion and proliferation of cells contacted with materials [3]. The aim of this work was to check the biocompatibility of composite materials in in vitro conditions using

as a biocompatibility marker NHOst line (Normal Human Osteoblasts).

## Materials and methods

### Materials

BOC fibres were formed by a wet process from solution using ethyl alcohol as a solvent. A large laboratory spinning machine with exchangeable modules was used. As nanoadditives commercial available (Sigma-Aldrich) TCP (>100 nm) and HAp (60-80 nm) were used. Thin layer of fibres with PLC were covered using two-step procedure: melt blow method and pressing (50°C). Unmodified and modified BOC mesh enriched with HAp or TCP and covered with PCL fibres, in shape of 13 mm in diameter and 1 mm in thickness disks, were used in the study. The disks were sterilised by immersing in ethanol and by UV radiation, and placed in 24-well culture plates (Nunc, Denmark).

### Cell culture

The biocompatibility of biomaterials was compared using normal human osteoblasts NHOst (Lonza, USA). The cells were routinely grown in 75 mL flasks in OGM Bullet Kit (Lonza, USA) suitable for osteoblasts, in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere at 37°C. A flask of cells was brought into suspension after incubating for 5 min in 0.5% trypsin plus EDTA (PAA, Austria). Following trypsinization, cells were washed by centrifugation at 400g for 5 min to give a pellet that was resuspended in fresh supplemented medium to a concentration of 3·10<sup>4</sup> cells/mL. Next, 1 mL of cell suspension was added to each well of 24-well plates containing sterile polymer samples. Tissue culture polystyrene (TCPS) bottom of empty wells served as a positive control. Cultures were performed for 3 and 7 days.

### Viability/proliferation and cytotoxicity tests

At the selected time points (3 and 7 days), half of the volume of supernatants from above cells cultured on biomaterials was collected for cytotoxicity test (ToxiLight, Lonza, USA). The viability/proliferation of osteoblasts was achieved by ViaLight test (Lonza, USA) according to the producer's protocol. Results were obtained with the aid of luminescence microplate reader PolarStar Omega (BMG Labtech, Germany).

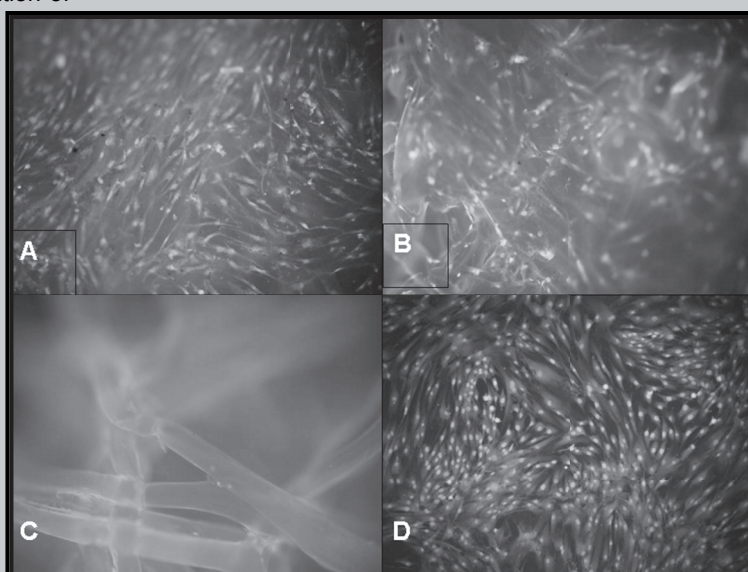
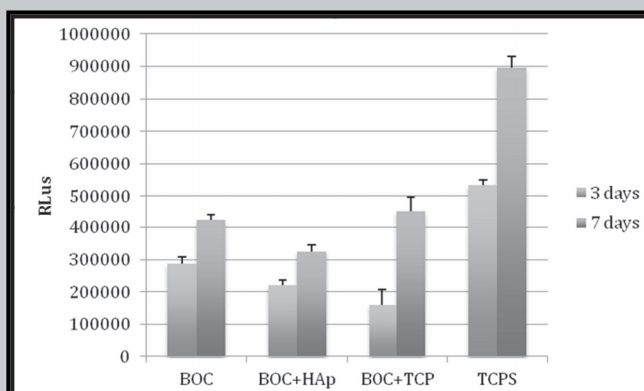
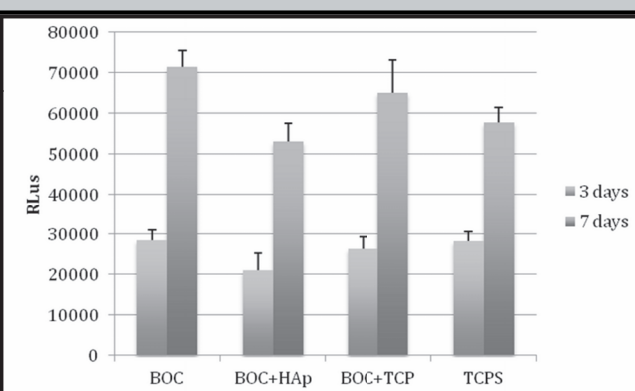


FIG. 1. The image of NHOst cells grown on the biomaterials surface after 7 days in culture. A) BOC, B) BOC+HAp, C) BOC+TCP, D) TCPS. Org. magn. 10x.



**FIG. 2.** The viability of osteoblasts cultured for 3 and 7 days in contact with biomaterials. RLus – Relative Luminescent units. All differences from control statistically significant when tested by means of the T-Tukey's test ( $p < 0.05$ ).



**FIG. 3.** The cytotoxicity of studied biomaterials after 3 and 7 days in culture with osteoblasts. RLus – Relative Luminescent units.

### Cell morphology and adhesion

NHOS cells grown on biomaterials were observed under fluorescent microscopy (Olympus, Japan). Prior to observation the cells were stained with acridine orange for 30 sec.

### Statistical analysis

At each time point four replicates were tested for the experimental and control samples, and four measurements on each sample were performed. The results were reported as mean values plus/minus the standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using the T-Tukey's test. The statistical significance of differences was set at  $p < 0.05$ .

### Results and conclusions

All studied biomaterials are biocompatible and promote the proliferation of NH osteoblasts (an evident increase of the cell number after 7 days of culture in comparison to the 3-day culture can be observed). It should be stressed that although the values of viability/proliferation test are much lower than in the case of control TCPS, the smooth surface of culture plate creates the best conditions for adhesion, spreading and proliferation of cells. However, although biocompatible, not all tested materials support the adhesion of NHOS cells. In the 7-day culture, very few cells adhered to the surface of BOC+TCP can be observed. High value of the viability test the material the BOC+TCP material owes to cells that are spread on the surface of TCPS, beneath the polymer mesh.

### Acknowledgements

Research financed by the Minister of Science and Higher Education in 2009-2012 as development projects: No. R08001706.

### References

- [1] A. Piattelli, A. Scarano, M. Paolantonio, *Biomaterials* 17 (1996) 1725-1731.
- [2] E. Stodolak, C. Paluszkiwicz, M. Błażewicz, I. Kotela; *Journal of Molecular* 924-926 (2009) 562-566.
- [3] E. Stodolak, C. Paluszkiwicz, M. Bogun, M. Błażewicz; *Journal of Molecular Structure* 924-926 (2009) 208-213



# IN VITRO STUDIES OF DIFFERENT TYPES OF CARBON NANOTUBES DEPOSITED ON PTFE MEMBRANE

ANETA FRACZEK-SZCZYPTA<sup>1\*</sup>, ELZBIETA MENASZEK<sup>1,2</sup>,  
MAGDALENA MIRANOWICZ<sup>1</sup>, STANISLAW BLAZEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AVE, 30-059 KRAKOW, POLAND  
<sup>2</sup>JAGIELLONIAN UNIVERSITY-COLLEGIUM MEDICUM,  
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY,  
9 MEDYCZNA STR, 30-068 KRAKOW, POLAND

\*MAILTO: AFRACZEK@AGH.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 116-117,(2012), 153-154]

## Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) are considered as a promising material for medical applications. In biological systems, they have been investigated as drug delivery vehicles, targeted cancer therapies, tissue scaffolds, and biosensors [1–3]. CNTs due to their relative large length-to-diameter aspect ratio, with a very large specific surface area suitable for highly sensitive molecular detection and recognition. Analysis of the

respectively. CNTs were synthesized at 750°C. In this temperature the mixture of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> was injected for 25 min with a flow 2 l/h and 15 l/h, respectively. All types of CNTs are shown in TEM microphotographs (FIG. 1). The pristine CNTs used in this experiment were denoted, as follows:

- MWCNT-A – multi wall carbon nanotubes obtained at AGH;
- MWCNT – multi wall carbon nanotubes obtained from NanoAmorUSA;
- SWCNH – single wall carbon nanohorns obtained from NanoCraftInc USA;
- ULSWCNT – ultra long single wall carbon nanotubes obtained from NanoAmorUSA.

For biocompatibility investigation, the CNTs were deposited on PTFE membrane filter (Whatman PTFE membrane) and then cultured with human osteoblast cells (NH<sub>4</sub>Ost) (Lonza, # CC-2538) for 3 and 7 days. To determine cytotoxicity of CNTs in contact with osteoblast ToxiLight® BioAssay Kit tests (LONZA Rockland, Inc.) were used. The interaction of nanotubes with NH<sub>4</sub>Ost was observed using a scanning electron microscopy (SEM, Nova NanoSEM 200, FEI).

The morphology of CNTs was analysed using transmission electron microscopy (TEM) (Tecnai G2 F20 (200 kV) and Joel). The degree of purification of CNTs was determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Multiwave 3000, Perkin Elmer Co.) and energy dispersive spectrometry (EDS) (EDAX Co.). The contact angle was measured by sessile drop method by an automatic drop shape analysis system DSA 10 Mk2 (Krüss, Germany).

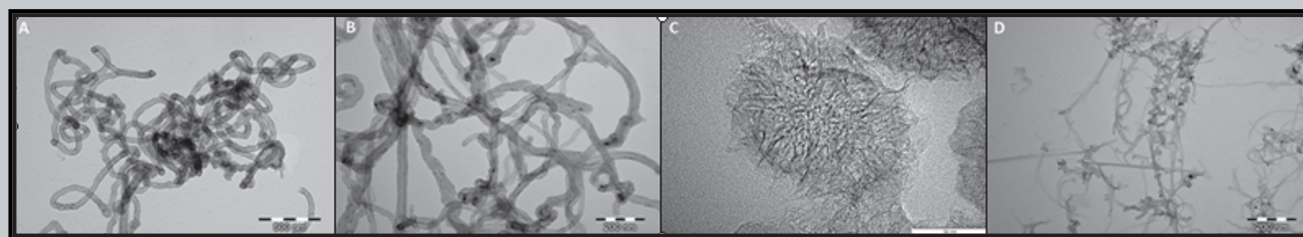


FIG. 1. TEM microphotographs of MWCNT-A (A), MWCNT (B), SWCNH (C) and ULSWCNT (D)

available literature shows also positive influence of CNTs on cells proliferation and adhesion. Especially, bone and nerve cells are stimulated to growth in direct contact with CNTs or with materials such as polymer and ceramic which are modified with CNTs [4–6].

The aim of this study is to compare the effects of different types of nanotubes deposited on polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane on cellular response. Four types of as-prepared CNTs differ in structure, diameter, length and purity were investigated in contact with the human osteoblast (NH<sub>4</sub>Ost). Additionally, the influence of CNTs on cells viability and their morphological condition in comparison with pure PTFE membrane was investigated.

## Materials and methods

Four types of as-prepared CNTs were investigated in this work. Three types of them were provided by NanoAmorUSA and NanoCraftInc USA and one was synthesis using chemical vapour deposition (CVD) method at the Department of Biomaterials (AGH, Krakow). Carbon nanotubes were synthesized in quartz tube furnace where as a substrate for CNTs growth, the silicon wafer was used. This substrate was covered by nickel (Ni) which was used as a catalyst for the growth of nanotubes. The carbon source and carrier gases were acetylene (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) and nitrogen (N<sub>2</sub>),

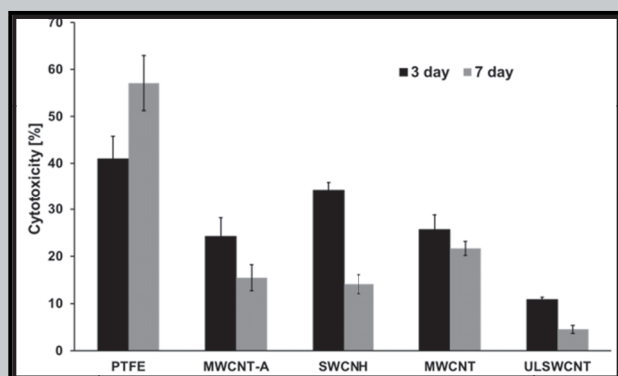
## Results and discussion

Carbon nanotubes used in this work possess different dimension and purity (TABLE 1). ICP-OES and EDS analysis of the as-prepared MWCNT and MWCNT-A indicated mainly the presence of nickel (Ni) catalyst in this sample. In the case of the pristine SWCNH and ULSWCNT, the ICP-OES analysis showed mainly the presence of iron (Fe) and cobalt (Co), respectively. Wettability of CNTs deposited on PTFE membrane is higher in comparison with polymer membrane (TABLE 1). Hydrophobic nature of CNTs and their ability to nanostructure the surface causes that the substrates modified by CNTs may possess the super hydrophobic nature. Super hydrophobic properties were especially observed for samples modified with MWCNT-A and ULSWCNTs.

Biological results show that membranes covered with CNTs have lower cytotoxicity in comparison with pure

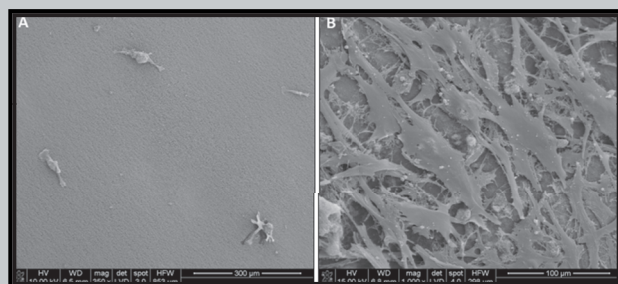
TABLE 1. Parameters characterizing CNTs.

	Diameter [nm]	Length [μm]	Purity [%]	Wettability [°]
MWCNT-A	50-70	2-5	0,9 (Ni) (EDS)	156,6±8,7
MWCNT	10-30	1-2	1,2 (Ni) (ICP)	146,7±6,6
SWCNH	2-3	30-50	1,8 (Fe) (ICP)	148,0±5,5
ULSWCNT	0,7-2	15-30	0,8 (Co) (ICP)	154,4±5,6
PTFE membrane	-	-	-	140,6±3,8



**FIG. 2. Cytotoxicity of osteoblast in contact with pure PTFE membrane and modified with CNTs after three and seven days of incubation.**

PTFE membrane what indicated that presence of this nanomaterials improve biocompatibility of polymer membrane (FIG.2). The lowest cytotoxicity was observed for samples containing ULSWCNTs and MWCNT-As; for those for which the contact angle was the highest. An interesting result is also that cytotoxicity for membranes with CNTs decrease with time of cells culture, whereas for pure PTFE increase. The cells morphology in contact with samples is the confirmation of quantitative analysis (FIG.3). Not only cells morphology which is typical for normal osteoblasts but also good adhesion and spreading indicates that CNTs improve biocompatibility of PTFE membrane in contact with bone cells. For comparison, the cells morphology on the PTFE is shown in FIG.3A.



**FIG. 3. SEM microphotographs of cells in contact with PTFE membrane (A) and PTFE membrane modified with MWCNTs (B).**

The presence of metal catalysts in CNTs may indirectly affect the cellular response. Especially Fe and Ni are known to adversely affect the cellular response. Analysing the samples with CNTs the highest cytotoxicity is observed for SWCNHs, MWCNTs and MWCNT-As where the iron and nickel are main contamination. The lowest cytotoxicity have sample where cobalt was used as catalyst (ULSWCNTs).

## Conclusions

Four kinds of as-prepared CNTs deposited on PTFE membranes were contacted with human osteoblast to verify their cytotoxicity. All kinds of CNTs have positive impact on cells growth and proliferation and simultaneously reduce cytotoxicity in comparison with pure PTFE sample. An interesting result is that the highly hydrophobic surface of samples modified with CNTs has a positive effect on osteoblast morphology and adhesion. Probably not only wettability has impact on cell growth but also another factors such as nanostructuring. Results also show that the type of catalyst used during the synthesis of CNTs can have

an impact on cellular response. The results are promising, but need further analysis and verification of other factors that may affect the cellular response.

## Acknowledgements

*This study has been supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, project no NN 507402039*

## References

- [1] A. M. Schrand, L. Dai, J. J. Schlager, S. M. Hussain, and E. Osawa: Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds. *Diamond and Related Materials* 16 (2007) 2118-2123.
- [2] J. Xu, M. Yudasaka, S. Kouraba, M. Sekido, Y. Yamamoto, and S. Iijima: Single wall carbon nanohorn as a drug carrier for controlled release. *Chemical Physics Letters* 461 (2008) 189-192.
- [3] B. S. Harrison and A. Atala: Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials* 28 (2007) 344-353.
- [4] J. Beuvelot, C. Bergeret, R. Mallet, V. Fernandez, J. Cousseau, M. F. Baslé, D. Chappard: In vitro calcification of chemically functionalized carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 4110-4117.
- [5] K. Sahithi, M. Swetha, K. Ramasamy, N. Srinivasan, N. Selvamurugan: Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 46 (2010) 281-283.
- [6] F. Tavangarian, Y. Li: Carbon nanostructures as nerve scaffolds for repairing large gaps in severed nerves. *Ceramics International* 38 (2012) 6075-6090.

# VANADIUM OXIDE RICH NANOTUBES ON BOTH PHASES OF ANODIZED Ti6Al4V ALLOY

AGNIESZKA KACZMAREK, KATARZYNA ARKUSZ,  
ELZBIETA KRASICKA- CYDZIK

UNIVERSITY OF ZIELONA GORA, MECHANICAL DEPARTMENT  
9 LICEALNA STR, 65-417 ZIELONA GORA, POLAND  
MAILTO:A.KACZMAREK@IBEM.UZ.ZGORA.PL,

## Abstract

*Ti6Al4V, if used as an implant material is becoming replaced by other titanium based medical alloys due to the toxicity of vanadium. Anodic modification carried out to obtain nanoporous structures on this two-phase material leads to the formation of oxides only over  $\alpha$  phase, vanadium rich  $\beta$  phase oxide being etched [1,2] due to the high solubility of V-oxides. However, vanadium oxides having excellent conductive [3,4] and catalytic [5] properties, with ability to bind proteins [6] and similar to phosphates in the metabolic affinity to insulin mimics [7]. Such properties are prospective for using anodised nanotubular layer of the Ti6Al4V as a biosensor platform. Anodizing the Ti6Al4V alloy in phosphoric acid with fluoride ions gives nanotubes presented in Fig.1a, whereas using 99.0% ethylene glycol with 0.6% fluorides leads to formation of uniform 50nm diameter nanotubes on both phases Fig.1b. To next experiments for thermal modification and electrochemical examination the most appropriate surface was obtained during anodization in 99% ethylene glycol with 0.6% of  $\text{NH}_4\text{F}$  in 20V during 20min. Thermal modification was carried in 600°C in three atmospheres (air, argon and nitrogen), only modification in nitrogen does not affect on the nanotubes morphology, in other cases shape and nanotubular character of oxide layer changes to nonregular oxide structures. Corrosion potential, cyclic voltametry and EIS studies carried in PBS solution for each of thermally modified oxide surface confirmed unique electric properties of obtained layers. Obtained novel coating with nanotubular  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , and VOX and their conductive, biological and catalytic properties may be a bioactive and cell growth stimulating layer, a platform for high sensitive sensors, or nanodimensional electrode material.*

[Engineering of Biomaterials, 116-117,(2012), 155]

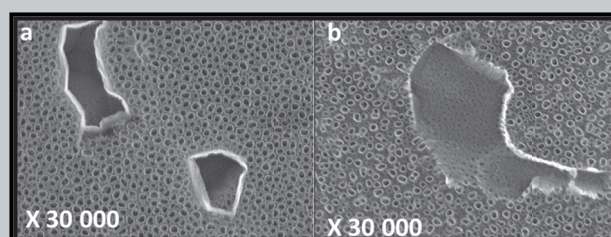


FIG. 1. Surface of Ti6Al4V after anodization in 1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  +0.3% HF (a), ethylene glycol+1%  $\text{H}_2\text{O}$ +0.6%  $\text{NH}_4\text{F}$ (b).

## References

- [1] Macak J.M., Tsuchiya H., Taveira L., Ghicov A., Schmuki P., J. Biomed. Mater. Res. 4 (2005) 928-933.
- [2] Luo B., ang H., Liu S., Fu W., Sun P., Yuan M., Zhang Y., Liu Z., Mat. Lett. 62(2008) 4512-4515.
- [3] Yang Y., Kim D., Schmuki P., Electrochem. Comm. 13 (2011) 1198-1201.
- [4] Yang Y., Kim D., Schmuki P., Electrochem. Comm. 13 (2011) 1021-1025.
- [5] Wang Y., Zhang Z., Zhu Y., Li Z., Vajtai R., Ci L., Ajayan P.M., ACSNano 7 (2008) 1492-1496.
- [6] Gannon G., O'Dwyer C., Larsson J.A., Thompson D., J. Phys. Chem. B., 115 (2011) 14518-14525.
- [7] Rehder D., Bioinorganic vanadium chemistry, John Willey & Sons 2008.